



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 47/48, C07C 237/06, C07D 295/12, 295/14		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/56423
			(43) Date de publication internationale: 17 décembre 1998 (17.12.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01220 (22) Date de dépôt international: 11 juin 1998 (11.06.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/07290 12 juin 1997 (12.06.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BISCHOFF, Rainer [DE/SE]; Åkarevägen 6, S-246 57 Barsebäck (SE). HEISSLER, Denis [FR/FR]; 4, rue Guynemer, F-67201 Eckbolsheim (FR). NAZIH, Abdesslame [MA/FR]; 3, rue de Drulingen, F-67000 Strasbourg (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: NOVEL LIPID COMPLEXES FOR TRANSFERRING AT LEAST A THERAPEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCE, IN PARTICULAR A POLYNUCLEOTIDE INTO A TARGET CELL AND USE IN GENE THERAPY (54) Titre: NOUVEAUX COMPLEXES LIPIDIQUES POUR LE TRANSFERT D'AU MOINS UNE SUBSTANCE THERAPEUTIQUEMENT ACTIVE, NOTAMMENT UN POLYNUCLEOTIDE, DANS UNE CELLULE CIBLE ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE			
<div style="text-align: center;"> <p style="text-align: right;">(I)</p> </div>			
(57) Abstract <p>The invention concerns a complex comprising at least a lipid and at least a therapeutically active substance useful for transferring said substance into a target cell, characterised in that said lipid is of formula (I): in which: n_1, n_2, identical or different are whole numbers between 0 and 1; R_1, R_2, identical or different are: a) selected among the group consisting of a hydrogen atom and alkyl radicals with 1 to 6 carbon atoms optionally substituted, independently of one another, by a hydroxyl radical; or b) in one particular case for which $n_1 = n_2 = 1$, R_1 and R_2 can form together a divalent alkylene chain of 2 to 3 carbon atoms (C_2-C_3); R_3, R_4, identical or different are alkyl radicals of 1 to 6 carbon atoms or can together form a divalent alkylene chain of 2 to 3 carbon atoms (C_2-C_3); m, p, identical or different are whole numbers between 1 and 10; R_5, R_6, identical or different are selected in the group consisting of radicals of formula: 1) $R_7 C(=O)-X-$ in which: $X = NH, O, S$; R_7 is an alkyl or alkenyl radical of 6 to 23 carbon atoms (C_6-C_{23}), linear or branched; 2) $R_8 R_9 NC(=O)-$ in which: R_8, R_9, identical or different are selected among the group consisting of the hydrogen atom or alkyl or alkenyl radicals of 6 to 23 carbon atoms, linear or branched, provided that R_8, R_9, cannot simultaneously correspond to the hydrogen atom; 3) and one of the radicals R_5, R_6 can moreover correspond to the hydrogen atom. The invention also concerns the use of said complex in gene therapy.</p>			

(57) Abrégé

L'invention concerne un complexe comprenant au moins un lipide et au moins une substance thérapeutiquement active utilisable pour le transfert de ladite substance à l'intérieur d'une cellule cible, caractérisé en ce que ledit lipide est de formule (I), dans laquelle: n_1 , n_2 identiques ou différents sont des nombres entiers choisis parmi 0 ou 1; R_1 , R_2 identiques ou différents, sont: a) choisis parmi le groupe constitué par un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués, indépendamment les uns des autres, par un radical hydroxyle; ou b) selon un cas particulier pour lequel $n_1 = n_2 = 1$, R_1 et R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C_2-C_3); R_3 , R_4 , identiques ou différents sont des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C_2-C_3); m , p identiques ou différents sont des nombres entiers compris entre 1 et 10; R_5 , R_6 , identiques ou différents sont choisis dans le groupe constitué par les radicaux de formule: 1) $R_7 C(=O)-X-$ dans laquelle: $X = NH, O, S$; R_7 est un radical de 6 à 23 atomes de carbone (C_6-C_{23}) alkyle ou alcényle, linéaire ou ramifié; 2) $R_8 R_9 NC(=O)-$ dans laquelle: R_8 , R_9 , identiques ou différents sont choisis parmi le groupe constitué par l'atome d'hydrogène ou des radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaires ou ramifiés, à la condition que R_8 , R_9 ne puissent correspondre simultanément à l'atome d'hydrogène; 3) et l'un des radicaux R_5 , R_6 pouvant en outre correspondre à l'atome d'hydrogène et son utilisation en thérapie génique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

NOUVEAUX COMPLEXES LIPIDIQUES POUR LE TRANSFERT D'AU MOINS UNE
SUBSTANCE THERAPEUTIQUEMENT ACTIVE, NOTAMMENT UN POLYNUCLEOTIDE,
DANS UNE CELLULE CIBLE ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

5 La présente invention concerne de nouveaux complexes
comprenant au moins un composé lipidique tel que défini ci-après
et au moins une substance thérapeutiquement active. Plus
particulièrement, la présente invention concerne l'utilisation
desdits complexes pour le transfert d'au moins une substance
10 thérapeutiquement active comportant des charges négatives,
notamment un polynucléotide, dans une cellule cible,
particulièrement une cellule de vertébré, et plus
particulièrement de mammifère.

 Le transfert de gène dans une cellule donnée est la base
15 même de la thérapie génique. Cette technologie dont le champ
d'application est vaste, permet d'envisager le traitement de
maladies graves pour lesquelles les alternatives thérapeutiques
classiques sont peu efficaces, voire inexistantes, et concerne
aussi bien les maladies d'origine génétique (hémophilie,
20 mucoviscidose, myopathie,...) qu'acquises (cancer, SIDA,...).

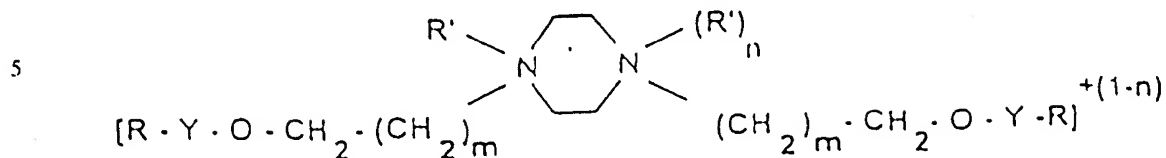
 Au cours des 30 dernières années, de nombreux outils ont
été mis au point permettant l'introduction de divers gènes
hétérologues dans des cellules, notamment des cellules de
mammifère. Ces différentes techniques peuvent être divisées en
25 deux catégories. La première catégorie concerne les techniques
physiques telles que la microinjection, l'électroporation ou le
bombardement particulaire qui, bien qu'efficaces, sont largement
limitées à des applications in vitro et dont la mise en oeuvre
est lourde et délicate. La seconde catégorie fait appel à des
30 techniques relatives à la biologie moléculaire et cellulaire
pour lesquelles le gène à transférer est associé à un vecteur de
nature biologique ou synthétique qui favorise l'introduction
dudit matériel.

Actuellement, les vecteurs les plus efficaces sont des vecteurs viraux, en particulier adénoviraux ou rétroviraux. Les techniques développées reposent sur les propriétés naturelles dont disposent ces virus pour traverser les membranes cellulaires, échapper à la dégradation de leur matériel génétique et faire pénétrer leur génome dans le noyau. Ces virus ont déjà fait l'objet de nombreuses études et certains d'entre eux sont d'ores et déjà employés à titre expérimental comme vecteurs de gènes chez l'homme en vue par exemple d'une vaccination, d'une immunothérapie ou d'une thérapie visant à suppléer une déficience génétique. Toutefois, cette approche virale présente de nombreuses limitations, notamment en raison de la capacité de clonage restreinte dans le génome viral, des risques de dissémination dans l'organisme hôte et dans l'environnement des particules virales infectieuses produites, du risque de mutagénèse artéfactuel par insertion dans la cellule hôte dans le cas des vecteurs rétroviraux, et de la forte induction des réponses immunitaire et inflammatoire *in vivo* lors du traitement thérapeutique, limitant considérablement le nombre d'administrations pouvant être envisagées (Mc Coy et al, 1995, Human Gene Therapy, 6, 1553-1560 ; Yang et al., 1996, Immunity, 1, 433-442). Ces nombreux inconvénients, notamment dans le cadre d'un usage chez l'homme, ont conduit plusieurs équipes à développer des systèmes alternatifs de transfert de polynucléotides.

Plusieurs méthodes non-virales sont disponibles à l'heure actuelle. Citons pour exemples la coprécipitation au phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs mimant les systèmes viraux (pour une revue voir Cotten et Wagner, 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4, 705-710), ou l'utilisation de polymères tels que le polyamidoamine (Haensler et Szoka, 1993, Bioconjugate Chem., 4, 372-379), ou de polymère tels que ceux présentés dans WO 95/24221 décrivant l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO 96/02655 décrivant l'utilisation de

polyéthylène imine, ou de polypropylène imine et les documents US-A- 5 595 897 et FR 2 719 316 décrivant l'utilisation de conjugués de polylysine. D'autres techniques non virales s'appuient sur l'utilisation de liposomes dont l'intérêt à titre
5 d'agent permettant l'introduction à l'intérieur de cellules de substances pharmaceutiquement actives, telles que par exemple l'ADN, l'ARN ou les protéines a été largement décrit dans la littérature. A cette fin, plusieurs équipes ont déjà proposé l'utilisation de lipides cationiques qui présentent une forte
10 affinité à l'égard des membranes cellulaires et/ou des acides nucléiques. En effet, bien qu'il ait été montré, dans le cas des acides nucléiques, que ce type de macromolécule est capable de traverser la membrane plasmatiche de certaines cellules in vivo (WO 90/11092), il n'en demeure pas moins que l'efficacité de la
15 transfection observée est encore très limitée, en raison notamment de la nature polyanionique des acides nucléiques qui prévient leur passage au travers de la membrane cellulaire, présentant elle-même une charge apparente nette négative. Dès 1989 (Felgner et al., Nature, 337, 387-388) les lipides
20 cationiques ont été présentés comme des molécules intéressantes pour favoriser l'introduction de grosses molécules anioniques, telles que les acides nucléiques, dans certaines cellules. Ces lipides cationiques sont capables de se complexer aux molécules anioniques tendant ainsi à neutraliser les charges négatives
25 desdites molécules et à favoriser leur rapprochement vers les cellules. De nombreuses équipes ont déjà développé différents lipides cationiques. A titre d'exemples, on peut citer le DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS, 84, 7413-7417), le DOGS ou Transfectam™ (Behr et al., 1989, PNAS, 86, 6982-6986), le DMRIE et
30 le DORIE (Felgner et al., 1993, Methods 5, 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang, 1991, BBRC, 179, 280-285), le DOTAP™ (McLachlan et al., 1995, Gene Therapy, 2, 674-622) ou la Lipofectamine™, ainsi que ceux décrits dans les demandes de brevet WO9116024 ou WO9514651 ou WO-A-9405624.

Plus particulièrement, la demande de brevet WO-A-9514651 décrit des lipides cationiques de formule :

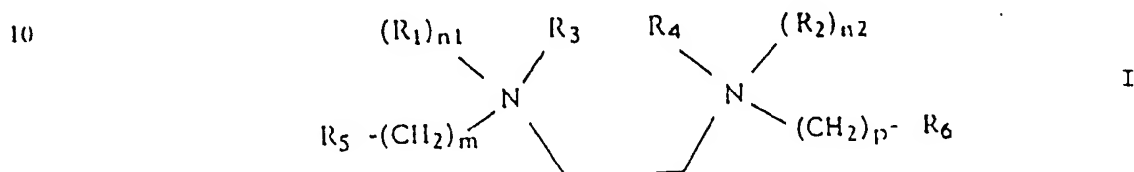


10 dans laquelle R est une chaîne linéaire, un groupe alkyle aliphatique de 5 à 29 atomes de carbone, Y est -CH₂- ou CO, R' est un radical alkyle inférieur, m est un nombre entier de 0 à 7, n est 0 ou 1, le nombre total d'atomes de carbone de R et (CH₂)_m étant au moins égal à 10.

Toutefois, plusieurs travaux (à titre d'exemples, voir
 15 Mahato et al., J. Pharm. Sci., 1995, 84, 1267-1271, Thierry et al., 1995, P.N.A.S., 92, 9742-9746) ont mis en évidence que l'efficacité du transfert à l'intérieur des cellules de la macromolécule anionique pouvait varier en fonction notamment de l'interaction entre les complexes et les membranes cellulaires,
 20 de la cellule considérée, de la composition lipidique des composés cationiques, de la taille des complexes formés avec les molécules anioniques et plus particulièrement du rapport de charges positives et négatives des différents composants dudit complexe. Les mécanismes qui permettent en particulier
 25 l'interaction des complexes avec les membranes cellulaires et le transfert des complexes à l'intérieur de la cellule sont encore largement méconnus et les chercheurs procèdent dans leurs travaux selon une approche fortement empirique. D'autres facteurs, tels que par exemple la formation des complexes, la
 30 stabilité, le comportement *in vivo*, ou éventuellement leur toxicité, rendent en outre le choix des lipides *a priori* non évident. Il est par conséquent souhaitable de proposer d'autres lipides cationiques, permettant de concevoir de nouveaux

vecteurs non-viraux ou complexes lipidiques ayant éventuellement des propriétés améliorées ou différentes de ceux déjà décrits.

La présente invention concerne en premier lieu un complexe comprenant au moins un lipide et au moins une substance
5 thérapeutiquement active, comportant notamment des charges négatives, utilisable pour le transfert de ladite substance à l'intérieur d'une cellule cible, caractérisé en ce que ledit lipide est de formule I :



15

dans laquelle :

n_1 , n_2 identiques ou différents sont des nombres entiers choisis parmi 0 ou 1,

R_1 , R_2 identiques ou différents, sont :

20 a) choisis parmi le groupe constitué par un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués, indépendamment les uns des autres, par un radical hydroxyle, ou

b) selon un cas particulier pour lequel $n_1 = n_2 = 1$, R_1 et R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2
25 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

R_3 , R_4 , identiques ou différents sont des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

30 m , p identiques ou différents sont des nombres entiers compris entre 1 et 10,

R_5 , R_6 , identiques ou différents sont choisis dans le groupe constitué par les radicaux de formule :

1) R_7 C(=O)-X- dans laquelle :

X = NH, O, S,

R₇ est un radical de 6 à 23 atomes de carbone (C₆-C₂₃) alkyle ou alcényle, linéaire ou ramifié,

2) R₀R₉NC(=O)- dans laquelle :

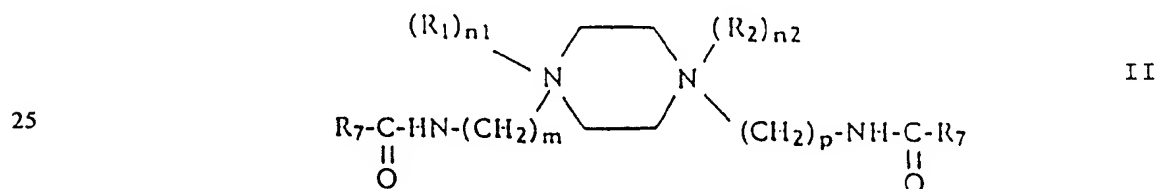
5 R₀, R₉, identiques ou différents sont choisis parmi le groupe constitué par l'atome d'hydrogène ou des radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaires ou ramifiés, à la condition que R₀, R₉ ne puissent correspondre simultanément à l'atome d'hydrogène, et

10 3) l'un des radicaux R₅, R₆ pouvant en outre correspondre à l'atome d'hydrogène .

Selon un cas très particulier, lorsque n₁ ou n₂ est égal à 0 et n₂ ou n₁ est égal à 1, respectivement, il est possible de former une chaîne alkylène à 1 seul atome de carbone entre les
15 deux azotes avec R₁, R₂. Une telle chaîne peut également être obtenue entre les deux azotes avec R₃ ou R₄.

Par le terme «alcényle», on entend indiquer que la chaîne carbonée dont il est question peut comprendre une ou plusieurs double(s) liaison(s) le long de ladite chaîne.

20 Selon une variante, le lipide compris dans un complexe de l'invention est un lipide de formule II :



dans laquelle :

30 n₁, n₂ identiques ou différents sont choisis parmi les nombres entiers 0 ou 1,

R₁, R₂, identiques ou différents sont choisis parmi le groupe consistant en un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone, éventuellement substitués indépendamment les uns des autres par des radicaux hydroxyles,

dans le cas particulier où $n_1 = n_2 = 1$, R_1 , R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone,

m, p identiques ou différents sont des nombres entiers
5 compris entre 1 et 10,

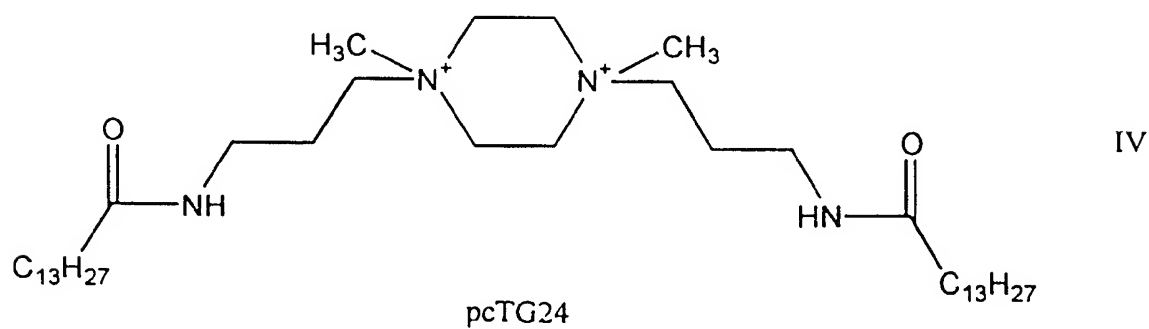
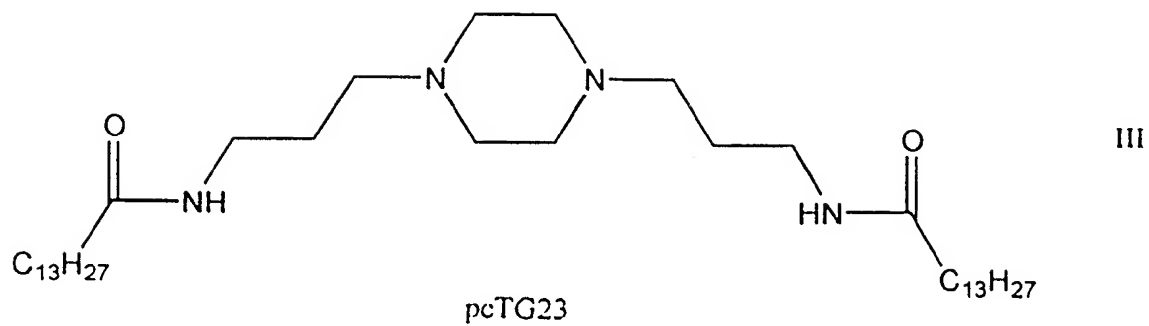
R_1 identique ou différent est un radical de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaire ou ramifié.

De préférence les radicaux R_1 , $C(=O)$, identiques ou différents sont des radicaux de 13 à 18 atomes de carbone ,
10 notamment les radicaux oléoyle, stéaroyle, palmitoyle, myristoyle.

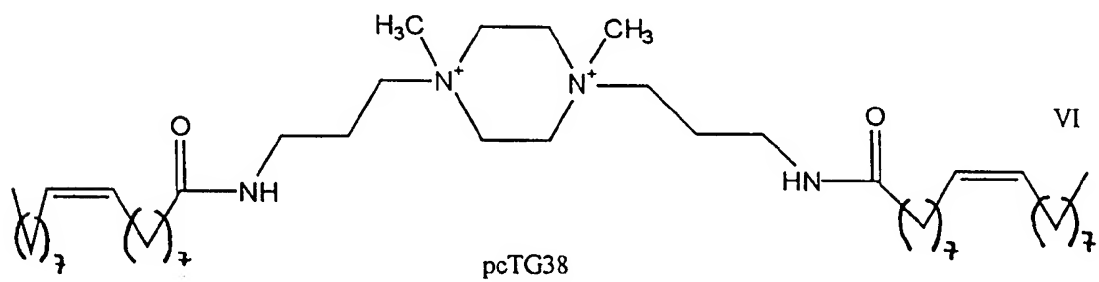
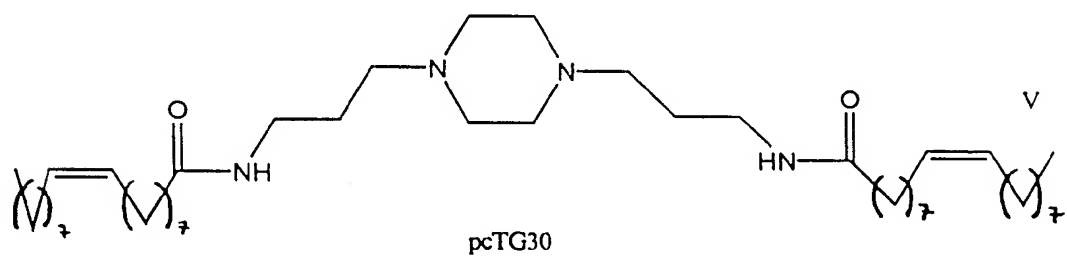
Selon un cas avantageux de l'invention, ledit lipide est sous forme cationique, c'est à dire qu'il est sous forme protonée par fixation d'un proton sur un ou plusieurs atomes
15 d'azote. Dans ce cas, ledit lipide cationique est associé à un ou plusieurs anions biologiquement acceptables, tels que par exemple l'anion trifluoroacétate, halogène, monométhylsulfate, acétate ou phosphate, iodure, chlorure, bromure... Bien entendu, et d'une manière générale, lorsque la somme $n_1 + n_2$ est 1 ou 2,
20 ledit lipide est associé à un anion de charge négative égale à $n_1 + n_2$ ou à deux anions de charge totale égale à $n_1 + n_2$ biologiquement acceptables. Par «anion biologiquement acceptable», on entend que les anions sont tels que les lipides cationiques peuvent être introduits dans la cellule ou être
25 présents dans la membrane cellulaire.

De préférence, les lipides compris dans les complexes selon l'invention sont choisis dans le groupe constitué par les composés de formules suivantes, éventuellement sous forme cationique :

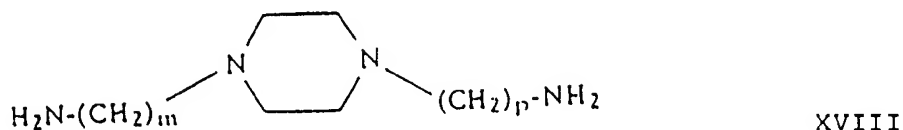
8



5



Les lipides cationiques de formule II utilisés selon l'invention sont préparés par réaction d'une tétramine de formule :



10 avec des acides de formule $R_7\text{COOH}$,

R_7 , m , p ayant la même signification que dans le composé de formule II pour obtenir le diamide correspondant.

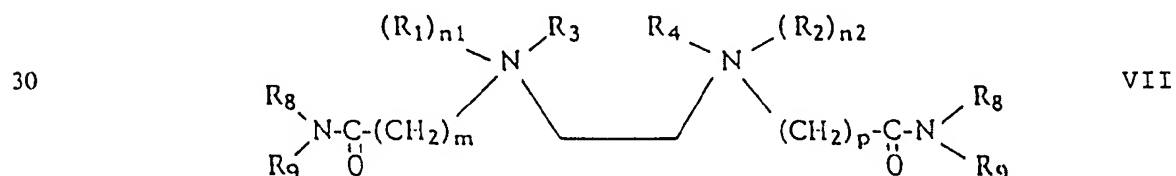
Ce dernier composé est éventuellement alkylé sur les atomes d'azote du cycle, par réaction avec un halogénure d'alkyle. Il
15 peut également être protonné sur les mêmes atomes d'azote par traitement avec un acide.

La réaction d'alkylation est effectuée au moyen d'un halogénure d'alkyle ou dihalogénure d'alkylène en milieu organique.

20 Pour une mise en oeuvre pratique, on se réfèrera aux exemples de réalisation indiqués dans la description.

Les procédés décrits sont applicables en général aux synthèses de lipides utilisés selon l'invention éventuellement après adaptations à la portée de l'homme du métier.

25 Selon une autre variante, le lipide compris dans les complexes de l'invention correspond à la formule VII :



dans laquelle :

n_1 , n_2 identiques ou différents sont des nombres entiers choisis parmi 0 ou 1,

R_1 , R_2 identiques ou différents, sont

5 a) choisis parmi le groupe constitué par un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués, indépendamment les uns des autres, par un radical hydroxyle, ou

b) selon un cas particulier pour lequel $n_1 = n_2 = 1$, R_1 et
10 R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

R_3 , R_4 , identiques ou différents sont des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

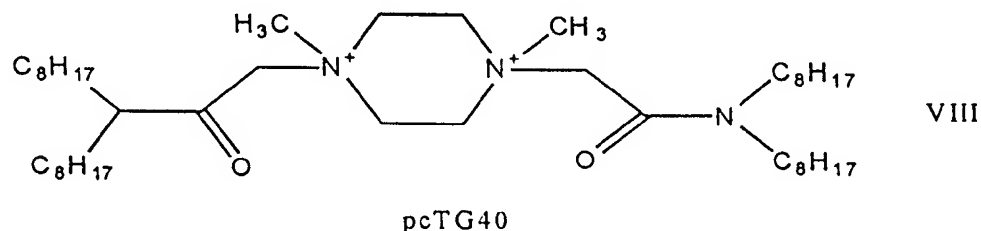
15 m, p identiques ou différents sont des nombres entiers compris entre 1 et 10,

R_8 , R_9 , identiques ou différents sont choisis parmi le groupe consistant en l'atome d'hydrogène ou des radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaires ou ramifiés,
20 à la condition que R_8 , R_9 ne puissent correspondre simultanément à l'atome d'hydrogène, et

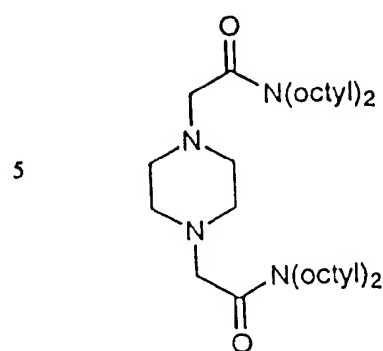
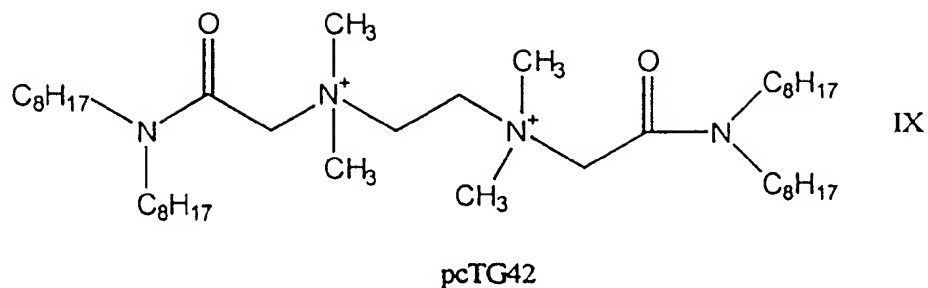
les radicaux NR_8R_9 de chaque côté de la molécule peuvent être différents.

De préférence R_8 et R_9 sont choisis parmi les radicaux de 6
25 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle.

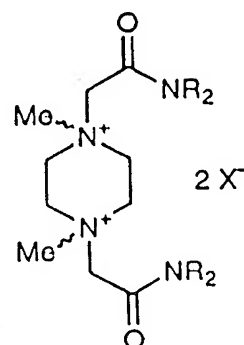
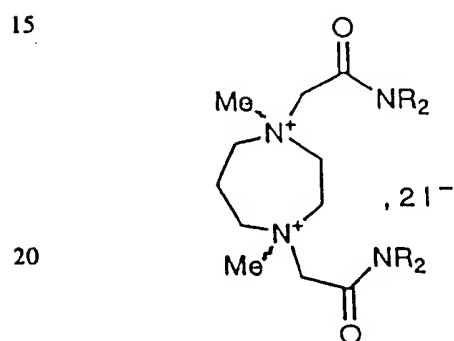
De préférence, les lipides des complexes sont choisis dans le groupe constitué par les composés de formules suivantes :

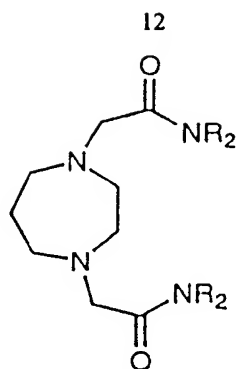


11



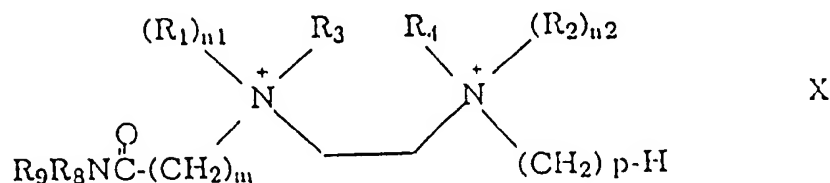
Diamide ANI 181

ANII 16 F1, ANII 16 F2 : R = -(CH₂)₇Me, X = I⁻ANII 150 F1, ANII 150 F2 : R = -(CH₂)₁₃Me, X = Br⁻ANII 157 F1, ANII 157 F2 : R = oléyle, X = Br⁻ANII 22 F1, ANII 22 F2 : R = -(CH₂)₇MeANII 152 F1, ANII 152 F2 : R = -(CH₂)₁₃Me.



Diamido ANII 21 : R = $-(CH_2)_7Mo$
 Diamido ANII 151 : R = $-(CH_2)_{13}Mo$

Selon une autre variante, le lipide utilisé correspond à la formule



dans laquelle :

n_1 , n_2 identiques ou différents sont des entiers choisis parmi 0 ou 1,

R_1 , R_2 , identiques ou différents, sont

a) choisis parmi le groupe constitué par un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués, indépendamment les uns des autres, par un radical hydroxyle, ou

b) selon un cas particulier pour lequel $n_1 = n_2 = 1$, R_1 et R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

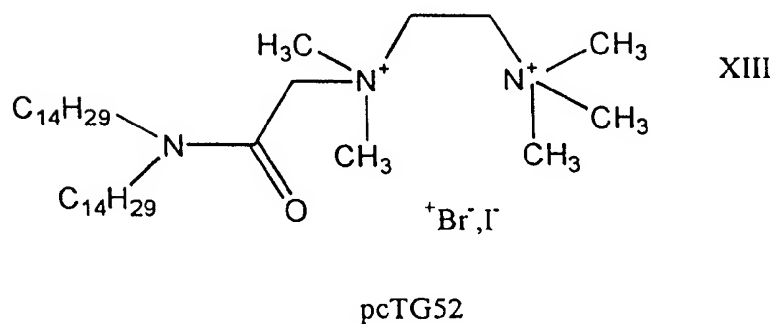
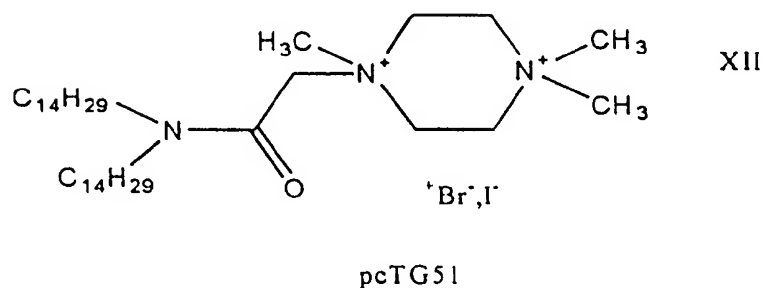
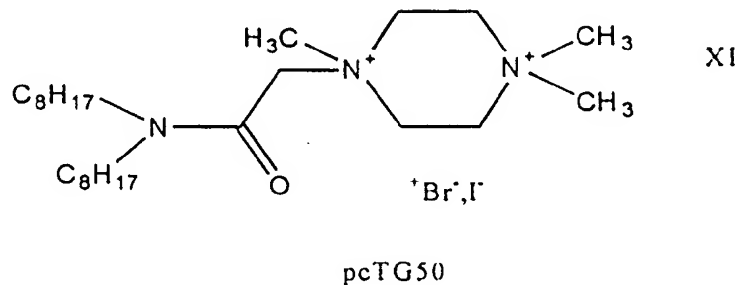
m , p identiques ou différents sont des nombres entiers compris entre 1 et 10,

R_8 , R_9 , identiques ou différents sont choisis parmi le groupe constitué par l'atome d'hydrogène et des radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaires ou ramifiés,

à la condition que R_8 , R_9 ne puissent correspondre simultanément à l'atome d'hydrogène.

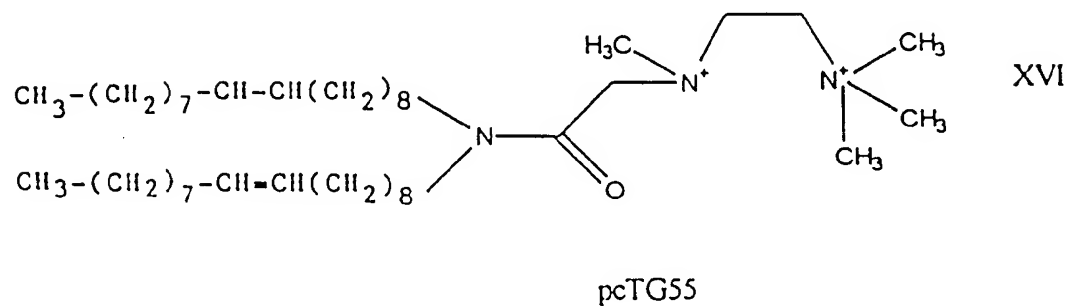
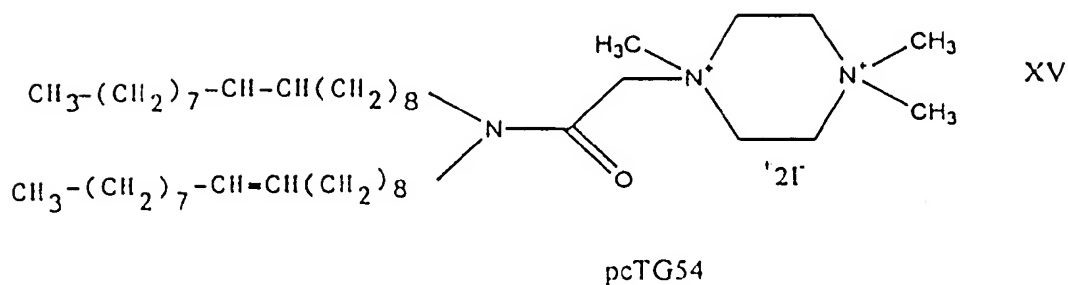
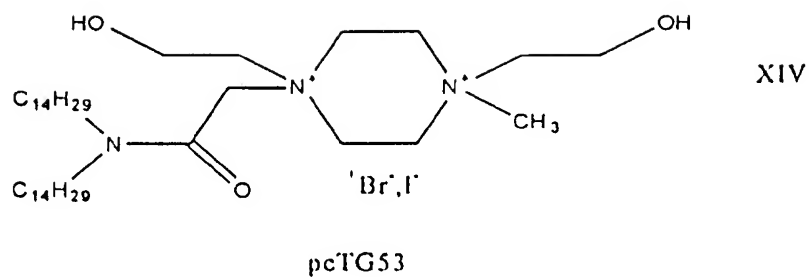
De préférence, de tels lipides sont choisis dans le groupe constitué par les composés de formules suivantes :

5

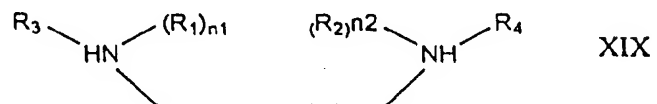


10

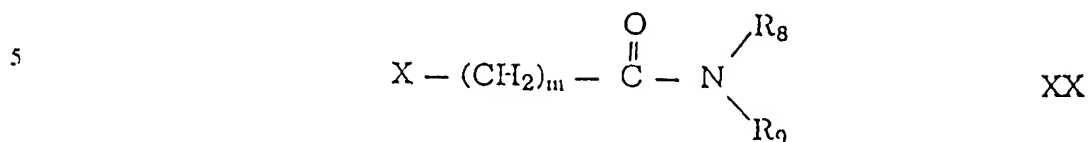
14



5 De tels lipides cationiques peuvent être préparés par réaction d'une diamine de formule :



avec un amide ω -halogéné de formule :



10 $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4, m, \text{R}_8, \text{R}_9$ ayant la même signification que dans la formule VII. X est un atome d'halogénure XX.

L'un des bromures utilisés à titre d'halogène ($m=1, p=1, \text{R}_8=\text{R}_9=\text{octyle}$) est déjà décrit dans Li, T. ; Diederich, F. J. Org Chem. 1992, 57, 3449-3454, de même que son utilisation dans la
15 dialkylation de $\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3\text{N}$ (=diazabicyclo[2.2.2]octène).

Toutefois, les lipides compris dans les complexes de l'invention ne sauraient se limiter à ceux obtenus par les modes de préparation décrits précédemment.

Par ailleurs, selon des variantes de réalisation de
20 l'invention, les lipides compris dans les complexes et décrits ci-dessus peuvent présenter les variations suivantes, prises ou non en combinaison entre elles:

de préférence R_1 et/ou R_2 ou R_3 et/ou R_4 est le radical méthyle ;

25 de préférence R_1 et R_2 ou R_3 et R_4 forment ensemble une chaîne éthylène ;

de préférence R_1 et R_2 ou R_3 et R_4 forment ensemble une chaîne propylène ;

de préférence m et/ou p sont des nombres entiers compris
30 entre 1 et 6 .

dans le cas de la formule X, de préférence m est un nombre entier compris entre 1 et 6, $p=1$.

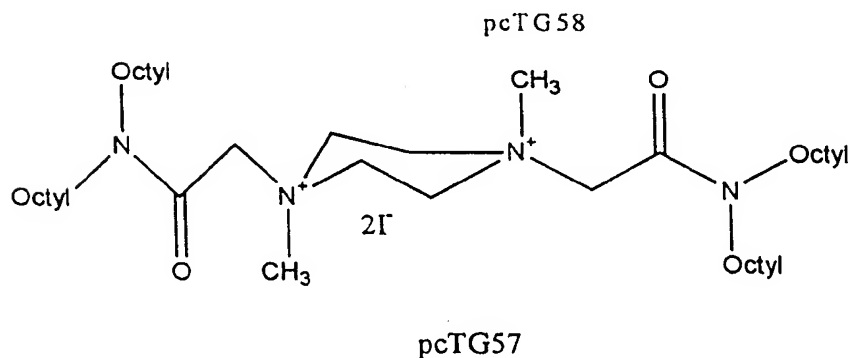
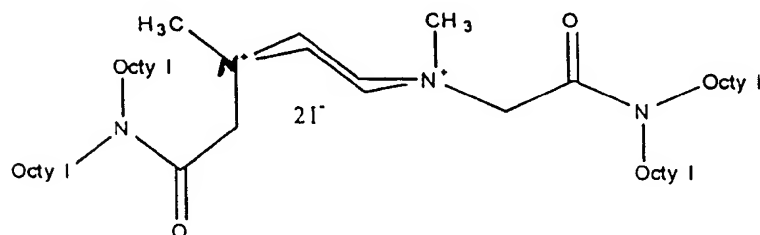
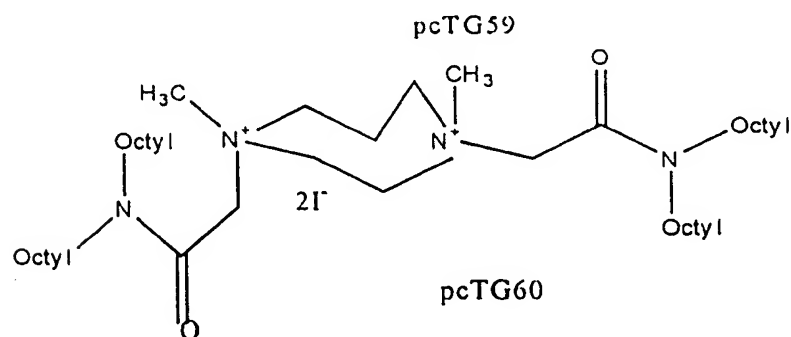
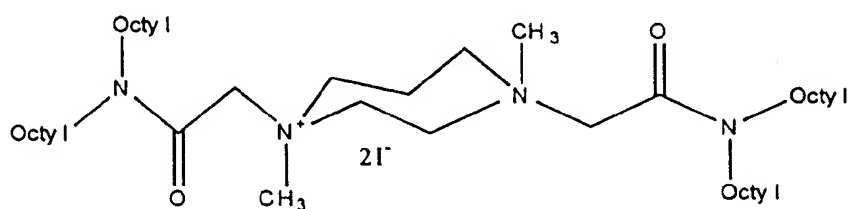
Selon un cas particulier de l'invention, un ou plusieurs ligands d'intérêt peuvent être fixés sur les lipides par

l'intermédiaire d'au moins un des atomes d'azote, voire de l'un des groupe R. De tels ligands peuvent notamment consister en une molécule de marquage (voir molécules de marquage dans US 4711955), une molécule de ciblage cellulaire (peptide GRP, 5 Gastrin Releasing Peptide, par exemple), une molécule d'ancrage. De tels éléments peuvent permettre le ciblage vers un type cellulaire particulier, faciliter la pénétration à l'intérieur de la cellule, la lyse des endosomes ou encore le transport intracellulaire et sont largement décrits dans la littérature. 10 Il peut s'agir par exemple de tout ou partie de sucres, de peptides, d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogéniques, de peptides de 15 localisation nucléaire, ou d'une combinaison de tels composés. On peut citer plus particulièrement les résidus galactosyl permettant de cibler le récepteur asialoglycoprotéique à la surface des cellules hépatiques, le peptide fusogénique INF-7 dérivé de la sous-unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus 20 influenza (Plank et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924) ou d'un signal de localisation nucléaire dérivé de l'antigène T du virus SV40 (Lanford et Butel, 1984, Cell 37, 801-813) ou de la protéine EBNA-1 du virus Epstein Barr (Ambinder et al., 1991, J. Virol. 65, 1466-1478). De tels conjugués peuvent être 25 aisément obtenus selon les techniques largement décrites dans la littérature.

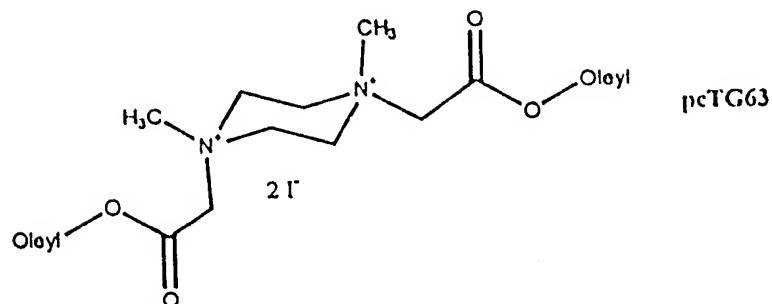
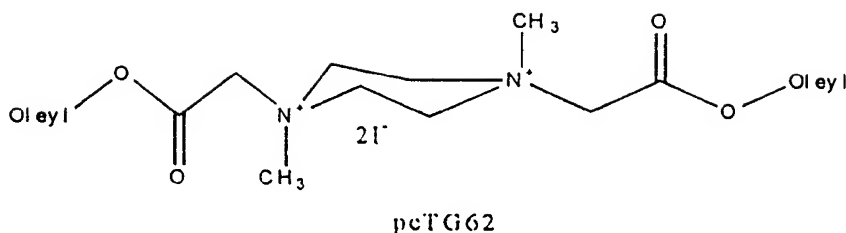
Il convient par ailleurs de préciser que l'invention concerne également des complexes comprenant l'un, l'autre ou un mélange des diastéréoisomères (cis et/ou trans) correspondant au 30 lipide compris dans un tel complexe. En effet, le déposant a par ailleurs montré que l'un ou l'autre de ces isomères (cis ou trans) pouvait présenter des propriétés améliorées par rapport à son isomères opposé (trans ou cis, respectivement) en terme d'efficacité de transfection. L'identification des isomères peut

aisément être réalisée selon des techniques bien connues de l'homme de l'art, notamment par mesure du spectre RMN et/ou cristallisation de la composition renfermant le lipide analysé.

A titre d'exemples de diastéréoisomères, on peut notamment
5 citer les lipides présentant les formules suivantes :



18



10 Selon un autre aspect, l'invention concerne également un
complexe lipide/substance thérapeutiquement active tel que
décrit précédemment caractérisé en ce qu'il comprend en outre au
moins un adjuvant susceptible d'améliorer la formation des
complexes entre undit lipide et une dite substance
15 thérapeutiquement active, ou d'améliorer le fonctionnement de
ces complexes vis-à-vis de la cellule.

De manière préférée, un tel adjuvant sera un lipide neutre
ou zwitterionique, tel que par exemple un triglycéride, un
diglycéride, le cholestérol (voir par exemple US 5 438 044), en
20 particulier, un lipide neutre ou zwitterionique qui est ou qui
dérive d'une phosphatidyl éthanolamine (PE),
phosphatidylcholine, phosphocholine, sphingomyéline, céramide ou
cérébroside. De manière avantageuse, on choisira la
dioleoylphosphatidyl éthanolamine (DOPE) ou la phosphatidyl
25 éthanolamine (PE).

Le rapport en poids entre le lipide et ledit adjuvant est
généralement compris entre 0,1 et 10, étant entendu que ce
rapport peut varier selon la nature des composants considérés.
L'homme du métier dispose des connaissances suffisantes pour

permettre ces adaptations mineures. Il est également possible d'utiliser un mélange de lipides neutres et/ou zwitterioniques ou encore un mélange de lipides cationiques et de lipides neutres et/ou zwitterioniques.

5 Selon un autre aspect, l'invention concerne également une composition destinée au transfert d'une substance thérapeutiquement active à l'intérieur d'une cellule cible comprenant au moins un lipide tel que ceux précédemment décrits pour les complexes et au moins un adjuvant tel que décrit ci-
10 dessus.

 Selon un mode particulier de réalisation, ladite substance thérapeutiquement active conformément à l'invention est choisie parmi les acides nucléiques et les protéines. De préférence, la substance active du complexe selon l'invention est un
15 polynucléotide, ledit lipide permettant alors d'améliorer le pouvoir transfectant du polynucléotide dans une cellule.

 Par «polynucléotide», on entend désigner un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel isolé ou de synthèse, désignant un enchaînement précis
20 de nucléotides, modifiés ou non (voir à titre d'exemple US 5525711), marqués ou non (voir, par exemple, US 4711955 ou EP 302175), permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique sans limitation de taille. Par polynucléotide on entend désigner notamment un cADN, un ADN génomique, un ADN
25 plasmidique, un ARN messager, un ARN antisens, un ribozyme, un ARN de transfert, un ARN ribosomique, ou un ADN codant pour de tels ARN. «Polynucléotide» ou «acide nucléique» sont des termes synonymes dans le cadre de la présente demande. Par "anti sens", on entend désigner un acide nucléique ayant une séquence
30 complémentaire à une séquence cible, par exemple une séquence d'ARNm dont on cherche à bloquer l'expression par hybridation sur la séquence cible; et par "sens", un acide nucléique ayant une séquence homologue ou identique à une séquence cible, par

exemple une séquence qui se lie à un facteur de transcription protéique et impliquée dans l'expression d'un gène donné.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ledit polynucléotide comprend un gène d'intérêt et des éléments permettant l'expression dudit gène d'intérêt. Dans ce mode de réalisation, ledit polynucléotide est avantageusement sous forme de plasmide. Les éléments permettant l'expression sont l'ensemble des éléments permettant la transcription dudit fragment d'ADN en ARN (ARN antisens ou ARNm) et la traduction de l'ARNm en polypeptide. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'excrétion ou l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV, MPSV, SV40, CMV ou 7.5k, du virus de la vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine, pour le surfactant pulmonaire. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices. Par ailleurs, ledit polynucléotide peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux séquences codantes d'ADN, identiques ou différentes, situées l'une par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou en sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdites séquences ne soit pas affectée. De même, dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques «neutres» ou introns qui n'affectent pas la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature. Ledit polynucléotide pourra

également renfermer des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la répllication et/ou pour l'intégration. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art. Par ailleurs, les polynucléotides selon la présente invention
5 peuvent également être des polynucléotides modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génôme de la cellule cible ou des polynucléotides stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine.

Dans le cadre de la présente invention, le polynucléotide
10 peut être homologue ou hétérologue à la cellule cible. Il peut être avantageux d'utiliser un polynucléotide qui code pour tout ou partie d'un polypeptide, notamment un polypeptide présentant une activité thérapeutique ou prophylactique, et plus particulièrement une activité immunogène de type cellulaire ou
15 humorale. Le terme polypeptide s'entend sans restriction quant à sa taille ou son degré de modification (par exemple de glycosylation). On peut à titre d'exemples citer les gènes codant pour un enzyme, une hormone, une cytokine, un récepteur membranaire, un polypeptide structural, un polypeptide formant
20 un canal membranaire, un polypeptide de transport, une molécule d'adhésion, un ligand, un facteur de régulation de la transcription, de la traduction, de la répllication, de la stabilisation des transcripts, ou un anticorps, tels que par exemple le gène codant pour la protéine CFTR, la dystrophine, le
25 facteur VIII ou IX, E6/E7 de HPV, MUC1, BRAC1, l'interféron β , l'interféron γ , l'interleukine (IL)2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-12, le facteur nécrosant de tumeur (TNF) de type alpha, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), le gène tk du virus Herpes Simplex de type 1 (HSV-1), le gène
30 associé au rétinoblastome ou p53 ou tout ou partie d'immunoglobulines, telles que les fragments F(ab)₂, Fab', Fab ou les anti-idiotypes (US 4,699,880). Bien entendu, cette liste n'est pas limitative et d'autres gènes peuvent être employés.

Selon un mode de réalisation préféré, les complexes selon l'invention sont de faible taille (inférieure à 500 nm, avantageusement à 200 nm et de préférence à 100 nm).

Par ailleurs, les expériences de transfection réalisées
5 montrent qu'avantageusement le rapport en poids du lipide audit polynucléotide est de 0,01 à 100. Le rapport optimal se situe de 0,05 à 10.

L'invention concerne également un procédé de préparation des complexes lipides cationiques/substances thérapeutiquement
10 actives anioniques, ledit procédé étant caractérisé en ce que l'on met en présence un ou plusieurs lipides sous forme cationique tels que décrits selon l'invention avec une ou plusieurs substances actives et en ce que l'on récupère ledit complexe. Elle concerne également les kits pour préparer de tels
15 complexes comprenant un ou plusieurs lipides ou une ou plusieurs compositions selon l'invention.

Dans un premier temps, selon une première variante, un ou plusieurs lipides cationiques sont mis en solution avec une quantité appropriée de solvant ou mélange de solvants miscibles
20 dans l'eau, notamment l'éthanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), ou de façon préférée un mélange éthanol/DMSO 1:1 (v:v), de manière à former des agrégats lipidiques selon une méthode connue décrite par exemple dans la demande de brevet WO-A-9603977, ou selon une seconde variante, sont mis en suspension avec une
25 quantité appropriée d'une solution de détergent comme un octylglucoside tel que le n-octyl β -D-glucopyranoside, ou le 6-O-(N-heptylcarbomoyl)-méthyl- α -D-glucopyranoside.

La suspension peut ensuite être mise dans un milieu tampon et mélangée avec une solution de substance thérapeutiquement
30 active comportant des charges négatives.

Dans le cas où l'on souhaite qu'un lipide neutre ou zwitterionique soit présent dans le complexe final, on forme, de manière connue, préalablement à la mise en solution dans le solvant miscible à l'eau ou dans la solution de détergent, un

film avec un mélange renfermant undit lipide cationique et undit lipide neutre ou zwitterionique, tel que par exemple la DOPE.

Une des caractéristiques importantes du procédé réside dans le choix du rapport entre les charges positives du lipide cationique et les charges négatives de la substance active.

Sans vouloir être limité par un rapport spécifique, on choisira des quantités des différentes charges de manière à ce que le rapport entre le nombre de charges positives du lipide cationique et le nombre de charges négatives de la substance thérapeutiquement active soit compris entre 0,05 et 20, notamment entre 0,1 et 15 et de préférence entre 5 et 10.

Le calcul pour arriver à un tel rapport prendra en considération les charges négatives portées par la substance active et on ajustera la quantité de lipide cationique nécessaire pour satisfaire au rapport indiqué ci-dessus. Les quantités et les concentrations pour les autres composants sont ajustées en fonction de leurs masses molaires respectives et de leur nombre de charges positives et/ou négatives.

Dans le cas de la seconde variante et de manière optionnelle, on peut procéder à une dialyse subséquente pour réduire le détergent et récupérer les complexes. Le principe d'une telle méthode est par exemple décrit par Hofland et al. (1996, PNAS 93, p 7305-7309) et dans le chapitre II du document Philippot et al. (G. Gregoriadis, 81-89, CRC Press 1993).

On a montré que la première variante conduit à d'excellents résultats en terme de taille des complexes obtenus.

Selon une troisième variante, un ou plusieurs lipides cationiques sont mis en suspension dans un tampon puis la suspension est soumise à une sonication jusqu'à homogénéité visuelle. La suspension lipidique est ensuite extrudée au travers de deux membranes microporeuses sous pression appropriée. La suspension lipidique est alors mélangée avec une solution de substance thérapeutiquement active comportant des

charges négatives. Cette technique dite de sonication-extrusion est bien connue dans l'art.

L'utilisation d'un lipide neutre ou zwitterionique, tel que la DOPE, peut s'avérer avantageuse pour l'obtention de complexes
5 de faible taille (inférieure à 200 nm, de préférence inférieure à 100 nm).

Les caractéristiques des complexes formés peuvent être évaluées par plusieurs moyens permettant de déterminer, par exemple :

- 10 - l'état de complexation avec la substance thérapeutiquement active, notamment par recherche des acides nucléiques libres par électrophorèse sur gel dans le cas où les substances sont des acides nucléiques,
- la taille des particules par diffusion quasi élastique de la
15 lumière,
- l'absence de précipitation à long terme.

La présente invention a également pour objet les complexes obtenus par la mise en oeuvre des procédés énumérés ci-dessus.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un complexe
20 selon l'invention pour transférer au moins une substance thérapeutiquement active, plus particulièrement un acide nucléique, dans des cellules cibles, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, plus particulièrement *in vivo*.

Par «cellules cibles» selon l'invention, on entend les
25 cellules procaryotes, les cellules de levure et les cellules eucaryotes, les cellules de plantes, les cellules humaines ou animales, et en particulier les cellules de mammifère. Il convient par ailleurs de citer les cellules cancéreuses. *In vivo*, l'invention peut être appliquée au niveau de l'espace
30 interstitiel ou luminal de tissus tels que le poumon, la trachée, la peau, le muscle, le cerveau, le foie, le coeur, la rate, la moelle osseuse, le thymus, la vessie, la lymphe, le sang, le pancreas, l'estomac, le rein, les ovaires, les testicules, le rectum, le système nerveux périphérique ou

central, les yeux, les organes lymphoïdes, les cartilages, l'endothélium. Selon un choix avantageux de l'invention, la cellule cible sera une cellule musculaire, une cellule souche hématopoïétique ou encore une cellule des voies aériennes, plus
5 particulièrement une cellule trachéale ou pulmonaire, et avantageusement une cellule de l'épithélium respiratoire.

Les complexes selon l'invention sont utilisables à titre de médicament, à but curatif, préventif ou vaccinal. C'est pourquoi l'invention a également pour objet les complexes de l'invention
10 à titre de médicament à but curatif, préventif ou vaccinal. De tels complexes peuvent être mis en oeuvre dans une méthode de traitement thérapeutique consistant à transférer au moins une substance thérapeutiquement active, notamment un polynucléotide, dans des cellules cibles, notamment une cellule de mammifère, et
15 plus précisément une cellule musculaire, une cellule souche hématopoïétique, une cellule des voies aériennes, plus particulièrement une cellule trachéale ou pulmonaire, une cellule de l'épithélium respiratoire...

Plus largement, la présente invention concerne également
20 un procédé pour introduire une substance thérapeutiquement active comportant des charges négatives à l'intérieur d'une cellule, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules cultivées sur un milieu approprié avec une suspension de complexes lipide cationique/substance thérapeutiquement active
25 comportant des charges négatives. Après un certain temps d'incubation les cellules sont lavées et récupérées. La vérification de l'introduction de la substance thérapeutiquement active peut être effectuée (éventuellement après lyse de la cellule) par tout moyen approprié.

30 Le procédé d'introduction est bien connu en soi. Par le terme «introduction» on entend que la substance thérapeutiquement active comportant des charges négatives est transférée dans la cellule et est localisée, en fin de procédé, à l'intérieur de ladite cellule ou au niveau de la membrane de

celle-ci. Dans le cas où la substance thérapeutiquement active est un acide nucléique, on parlera plus particulièrement de «transfection». Dans ce cas, la vérification de la transfection de l'acide nucléique pourra être effectuée par tout moyen
5 approprié, par exemple par mesure de l'expression du gène considéré ou de la concentration de la protéine exprimée.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation d'un complexe ou d'une composition selon l'invention pour la préparation d'un médicament à but curatif, préventif ou
10 vaccinal, destiné au traitement du corps humain ou animal, notamment par thérapie génique.

Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple dans un muscle, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter
15 l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter *in vitro* selon la présente invention et de les réadministrer au patient.

20 Les complexes selon l'invention peuvent être administrés par voie intramusculaire, intratrachéale, intranasale, intracérébrale, intrapleurale, intratumorale, intracardiaque, intragastrique, intrapéritonéale, épidermique, intraveineuse, intraartérielle par seringue ou tout autre moyen équivalent, les
25 systèmes adaptés au traitement des voies aériennes ou des muqueuses tels que l'inhalation, l'instillation, ou l'aérosolisation. On peut également citer les modes d'administration par application d'une crème, par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art
30 et applicable à la présente invention.

Il est également dans la portée de l'invention de cibler des organes ou des tissus particuliers par administration, notamment par voie intraveineuse, d'un complexe selon l'invention préparé de façon à ajuster le rapport composé ou

composition/substance thérapeutiquement active dans ledit complexe, la charge apparente du complexe (voir notamment Liu et al, 1997, Gene Therapy, 4, 517-523 ; Thierry et al., 1995, P.N.A.S., 92, 9742-9746).

5 L'invention concerne également un procédé de thérapie génique consistant à administrer à un patient une quantité appropriée d'un complexe selon l'invention. Selon la présente invention et dans le cadre d'une thérapie génique in vivo, il est possible de répéter plusieurs fois, chez un patient donné,
10 le procédé tel que proposé sans qu'aucune réaction immunitaire majeure ne soit déclenchée à l'encontre de l'un des composés administrés. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain intervalle de temps. L'administration répétée permettrait de réduire la
15 quantité de substance thérapeutiquement active, d'ADN plus particulièrement, à administrer pour une dose donnée. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du polynucléotide à transférer.

20 L'invention concerne plus particulièrement une préparation pharmaceutique comprenant au moins un complexe tel que décrit précédemment, renfermant éventuellement en outre au moins un adjuvant capable de stabiliser ladite préparation pharmaceutique en vue de son stockage par exemple et/ou d'améliorer le pouvoir
25 de transfection dudit complexe. Un tel adjuvant pourrait par exemple être choisi parmi le groupe consistant en la chloroquine, un composé polaire protique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, le 1-méthyl L -2-pyrrolidone ou leurs dérivés, ou un
30 composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tétraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés. De même, ladite préparation

peut renfermer un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique permettant son administration à l'homme ou l'animal.

Dans le cadre de la mise en oeuvre d'un procédé de traitement *in vivo* selon la présente invention, il est en outre possible d'effectuer, avant l'administration d'une préparation pharmaceutique telle que décrite précédemment, un traitement du patient visant à observer une déplétion temporaire des macrophages permettant d'améliorer le taux de transfection. Une telle technique est décrite dans la littérature, voir notamment Van Rooijen et al., 1997, TibTech, 15, 178-184.

Enfin, l'invention concerne une cellule transfectée par un complexe tel que défini précédemment, particulièrement une cellule procaryote, une cellule de levure ou eucaryote, notamment une cellule animale, en particulier une cellule de mammifère, et plus particulièrement une cellule cancéreuse. Selon un cas préféré de l'invention, ladite cellule est une cellule des voies aériennes, plus particulièrement une cellule trachéale ou pulmonaire, et avantageusement une cellule de l'épithélium respiratoire.

Les exemples ci-après illustrent l'invention sans la limiter en aucune façon.

Légende des figures :

Figures 1 à 14 :

25 Transfection *in vitro* des cellules A549 à partir de différents complexes ADN/lipide cationique selon l'invention.

Figure 1 : pcTG51 en absence de DOPE.

Figure 2 : pcTG51 en présence d'une quantité équimolaire de DOPE.

30 Figure 3 : pcTG52 en absence de DOPE.

Figure 4 : pcTG52 en présence d'une quantité équimolaire de DOPE.

Figure 5 : pcTG53 en absence de DOPE.

Figure 6 : pcTG53 en présence d'une quantité équimolaire de DOPE.

Figure 7 : pcTG54 en absence de DOPE.

Figure 8 : pcTG54 en présence d'une quantité équimolaire de DOPE

5 Figure 9 : pcTG57 avec ou sans DOPE.

Figure 10 : pcTG58 avec ou sans DOPE.

Figure 11 : pcTG59 en absence de DOPE

Figure 12 : pcTG59 en présence d'une quantité équimolaire de DOPE

10 Figure 13 : pcTG60 en absence de DOPE.

Figure 14 : pcTG60 en présence d'une quantité équimolaire de DOPE.

Pour chacune des figures, la présence ou l'absence de DOPE de veau fœtal est indiquée (+) et (-) respectivement ; la quantité d'ADN plasmidique par puits est précisée en abscisse (0.5, 1 ou 15 0.05 µg/puits) ; les rapports de charges sont précisés dans les légendes (0.8, 1.25, 2.5, 5 ou 10) ; en ordonnées est indiquée l'activité luciférase mesurée exprimée en fg de luciférase / mg de protéine totale.

20 Exemple 1

Synthèse du lipide cationique pcTG23 de formule I dans laquelle $n_1=n_2=0$ R_1, R_2 chaîne éthylène $m=p=3$ $R_3=R_4=NHCO C_{13}H_{27}$.

Une solution de dicyclohexylcarbodiimide (2,06 g ; 9,98 mmol) dans le chloroforme sec (5ml) est additionnée à une 25 solution de 1,4-bis(3-aminopropyl)pipérazine (1,00 g ; 5,00 mmol), d'acide myristique (2,28 g ; 9,98 mmol) et de 1-hydroxybenzotriazole (1,42 g ; 10,5 mmol) dans le chloroforme sec (15 ml). Le mélange réactionnel est agité pendant 4h à température ambiante puis filtré pour enlever la

dicyclohexylurée. Le filtrat est concentré sous pression réduite et chromatographié sur une colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane/méthanol 9/1) pour donner le diamide pCTG23 (2,7 g ; 87%) ayant un point de fusion de 117-118°C.

5

RMN-¹H (200MHz, CDCl₃) : δ 6,87 (t large, J = 5,5 Hz, 2H, -NH-C(O)-) ; 3,33 (q, J = 5,9 Hz, 4H, -CH₂-NH-C(O)-) ; 2,65-2,37 (m et t, J = 6,3Hz, 12H, -CH₂-N) ; 2,13 (t, J = 7,6Hz, 4H, -CH₂-C(O)-), 1,75-1,50 (m et quint., J = 6,3Hz, 8H, -CH₂-CH₂-C(O)- et -CH₂-CH₂-NH-) ; 1,25 (s, 40H, -CH₂-) ; 0,87 (t, J = 6,4Hz, 6H, Me-).

10

Spectrométrie de masse : masse calculée = 621,1 Da ; masse mesurée = 620,6 Da.

15

Exemple 2

Synthèse du lipide cationique pCTG24 de formule I dans laquelle R₁ = R₂ = méthyle ; R₃R₄ ensemble forment un reste éthylène ; m = 3 ; p = 3 ; R₅ et R₆ sont des radicaux NH C(=O) C₁₁H₂₃ (C₁₁H₂₃ reste n-tridécylo)

20

0,5 ml d'iodométhane (8,0 mmoles) et une suspension de diamide pCTG23 (100 mg ; 0,16 mmole) dans 4 ml d'acétonitrile sont mis à reflux pendant 40 h, refroidis jusqu'à la température ambiante et dilués dans 20 ml d'éther. La suspension ainsi obtenue est filtrée pour donner une poudre jaune pâle qui est

25

lavée avec de l'éther et séchée sous vide. Après recristallisation dans le mélange chloroforme-méthanol, on obtient le lipide cationique pCTG24 de formule I (135 mg ; 93 %) dont le point de fusion est de 198°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃ - CF₃CO₂D) : δ 4,30-4,00 (m, 12H, -CH₂-N⁺), 3,54 (s large, 10H, -CH₂-NH-CO- et Me-N⁺), 2,48 et 2,44 (2 t, J = 7,5 Hz, 4H,

30

-CH₂-CO-), 2,22 (m, 4H -CH₂-CH₂-NH-CO-), 1,62 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CO-), 1,25 (s, 40H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6H, Me-).

Spectrométrie de masse : calculée 651,2 Da, trouvé 650,6 Da ; analyse calculée pour $C_{40}H_{82}I_2N_4O_2$: C, 53,09 % , H, 9,13 % ; N, 6,19 % . trouvé : C, 53,1 % ; H, 9,1 % ; N, 6,2 % .

Exemple 3

5 Synthèse du lipide cationique pcTG40 de formule I dans laquelle R_3, R_4 = chaîne éthylène ; R_1, R_2 = méthyle ; $m = p = 1$; $R_5 = R_6 = (C_8H_{17})_2NC(=O)$

Synthèse du 2-bromo-N,N-dioctylacétamide (cf : Li, T.; Diederich, F. J. Org. Chem. 1992, 57, 3449-3454).

10 Une solution de bromure de bromoacétyle (0,69 ml ; 7,94 mmoles) dans le tétrahydrofurane (2ml) à 0°C est additionnée à un mélange de dioctylamine (2,00 ml ; 6,62 mmoles) et de diisopropyléthylamine (1,73 ml ; 9,93 mmoles) dans le tétrahydrofurane (13 ml). Le mélange est agité pendant 1 h à
15 température ambiante, puis dilué avec de l'éther (25 ml) et lavé avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10% (10 ml).

La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium, concentrée sous pression réduite et purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :
20 hexane/éther 85/15) pour donner du 2-bromo-N, N-dioctylacétamide (2,23 g ; 93%) sous forme d'une huile brune.

RMN- 1H (200MHz, $CDCl_3$) : δ 3,83 (s, 2H, $BrCH_2-C(O)-$) ; 3,31 et 3,27 (2t, $J = 6,5Hz$, 4H, $-CH_2)_2N-C(O)-$) ; 1,57 (m, 4H, $-CH_2-CH_2)_2N-C(O)-$) ; 1,28 (s, 20H, $-CH_2-$) ; 0,89 et 0,87 (2t, $J = 6,4Hz$, 6H, Me-).
25

Lipide cationique pcTG40

Une solution de N,N'-diméthyl-1,4-piperazine (30 mg ; 0,26 mmole) et de 2-bromo-N,N-dioctylacétamide (200mg ; 0,55 mmole) dans l'acétonitrile (2ml) est chauffée au reflux pendant 16h.
30 La solution est concentrée sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane/méthanol 95/5 puis 90/10) pour donner le lipide cationique pcTG40 (166 mg : 76%) ayant un point de fusion de 169-170°C.

RMN-¹H (200MHz, CDCl₃) : δ 5,38 (s, 4 H, N'-CH₂-C(O)-) ; 5,00-4,87 et 4,78 - 4,65 (2m, 8H, -CH₂-N') ; 4,01 (s, 6 H, Me-N') ; 3,40- 3,20 (m, 8 H, -CH₂)₂N-C(O) ; 1,53 (m, 8 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)- ; 1,27 (s large, 40H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4Hz, 12H, Me-).

5 Spectrométrie de masse : masse calculée = 679,2 Da ; masse mesurée = 678,8 Da.

Exemple 4

Synthèse du lipide cationique pcTG42 de formule I dans laquelle R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = méthyle ; m = p = 1 ; R₅ = R₆ = C(=O)-N(C₈H₁₇)₂, (C₈H₁₇) = n-octyle.

10 La même procédure que pour le lipide cationique pcTG40 permet la préparation du lipide cationique pcTG42 (498 mg ; 92%), sous forme d'une cire, à partir de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (75 mg ; 0,64 mmole) et de 2-bromo-N,N-dioctylacétamide (700 mg ; 1,93 mmole).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) ; δ 5,13 (s, 4H, N'-CH₂-C(O)-) ; 4,84 (s, 4H, -CH₂-N') ; 3,72 (s, 12H, Me-N') ; 3,30 (m, 8H, -CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,75-1,45 (m, 8H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,28 (s, 40H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 12H, Me-).

20 Spectrométrie de masse : masse calculée = 681,2 Da ; masse mesurée 681,0 Da.

Exemple 5

Synthèse du lipide cationique pcTG30 de formule I dans laquelle n₁=n₂=0, R₃, R₄ chaîne éthylène, m=p=3, R₅=R₆=HN-(O=)C-C₁₇H₃₃.

25 La même procédure que pour le diamide pcTG23 permet la préparation du diamide pcTG30 (1,09 g ; 84%) ayant un point de fusion de 79°C à partir de 1,4-bis(3-aminopropyl)pipérazine (0,355 g ; 1,77 mmole) et d'acide oléique (1,00 g ; 3,54 mmoles) en présence de 1-hydroxybenzotriazole (0,502 g ; 3,72 mmoles) et de dicyclohexylcarbodiimide (1,10 g ; 5,31 mmoles).

30 RMN-¹H (200MHz, CDCl₃) : δ 6,79 (t, J = 5 Hz, 2H, -NH-C(O)-) ; 5,33 (m, 4 H, -CH=) ; 3,33 (q, J = 5,9 Hz, 4H, -CH₂-NHC(O)-) ; 2,88-2,38 (m et t, J = 6,3Hz, 12H, -CH₂-N-) ; 2,13 (t, J = 7,5Hz, 4H, -CH₂-C(O)-), 2,00 (m, 8 H, -CH₂-CH=) ; 1,78-1,52 (m et

quint., $J = 6,3\text{Hz}$, 8H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ et $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{NH}$) ; 1,30 et 1,26 (2s, 40H, $-\text{CH}_2-$) ; 0,87 (t, $J = 6,4\text{Hz}$, 6H, Me-).

Spectrométrie de masse : masse calculée = 729,2 Da ; masse mesurée = 728,7 Da.

5 Exemple 6

Synthèse du lipide cationique pcTG38 de formule I dans laquelle $R_1=R_2=\text{Méthyle}$; R_3, R_4 chaîne éthylène ; $m=p=3$; $R_5=R_6=\text{HN}-(\text{O})\text{C}-\text{C}_{17}\text{H}_{33}$

La même procédure que pour le lipide cationique pcTG24 permet la
10 préparation du lipide cationique pcTG38 (135 mg : 97%), ayant un point de fusion de 175-180°C (décomposition), à partir du diamide pcTG30 (100 mg ; 0,137 mmole) en suspension dans l'acétonitrile (4ml) et d'iodure de méthyle (0,5 ml ; 8,0 mmoles).

15 RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) ; 5,35 (m, 4H, $-\text{CH}=\text{}$) ; 4,35-3,90 (m, 12H, $-\text{CH}_2-\text{N}'$) ; 3,58 (t, $J = 5,8\text{Hz}$, 4H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$) ; 3,48 et 3,45 (2s, 6H, $-\text{Me}-\text{N}'$) ; 2,49 (t, $J = 7,7\text{Hz}$, 4H, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$) ; 2,20 (m, 4H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{N}'$) ; 2,01 (m, 8H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}=\text{}$) 1,57-1,75 (m, 4H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$) ; 1,30, 1,29 et 1,27 (3s, 40H, $-\text{CH}_2-$)
20) ; 0,87 (t, $J = 6,2\text{Hz}$, 6H, $-\text{Me}$).

Spectrométrie de masse : masse calculée = 759,3 Da ; masse mesurée 759,0 Da.

Exemple 7

25 Lipide cationique pcTG51 de formule I dans laquelle $R_1 = R_2 = \text{méthyle}$; R_3, R_4 chaîne éthylène ; $m = p = 1$; $R_5 = (\text{C}_{14}\text{H}_{29})_2\text{NC}(\text{O})$; $R_6 = \text{H}$

a) Une solution de N,N'-diméthyl-1,4-pipérazine (0,13 g ; 1,13 mmole) dans l'acétonitrile est additionnée lentement à une solution de 2-bromo-N,N-ditétradécylacétamide (0,30 g ; 0,56
30 mmole) dans l'acétonitrile (5 ml). Ensuite, le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 0,5 h, puis à 40°C pendant 1 h. L'acétonitrile et l'excès de N,N'-diméthyl-1,4-pipérazine sont évaporés sous pression réduite.

b) De l'iodométhane (1 ml) est additionné à une solution dans l'acétonitrile (5 ml) du liquide résiduel obtenu ci-dessus. Le mélange est chauffé à reflux pendant 4 h puis, après refroidissement, de l'éther (2 ml) est ajouté. Le précipité blanc qui se forme alors est filtré sur papier puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol/dichlorométhane 15/85) pour donner le lipide cationique pcTG51 (0,41 g; 92%) sous forme d'un solide blanc.

Point de fusion F = 168-170°C (décomposition).

10 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 4,93 (s, 2H, > N'(Me)-CH₂-C(O)-) ; 4,80 et 4,50-4,00 (2 m, 2 H et 6 H, Me₂N'(CH₂-CH₂)₂N'(Me)-) ; 3,69 (s, 3H, >N'(Me)-CH₂-C(O)-) ; 3,58 et 3,53 (2s, 6H, Me₂N'<) ; 3,32 (m, 4H, -CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,59 (m, 4H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-) ; 15 1,26 (s, 44H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6H, Me-).

Exemple 8

Lipide cationique pcTG52 de formule I dans laquelle R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = méthyle; m = p = 1 ; R₅ = (C₁₄H₂₉)₂NC(O) ; R₆ = H

La même procédure que pour le lipide cationique pcTG51 permet la préparation du lipide cationique pcTG52 (0,42 g; 94%) sous forme d'un solide blanc, à partir de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (0,13 g ; 1,13 mmole), de 2-bromo-N,N-ditétradécylacétamide (0,30 g ; 0,57 mmole) et d'iodométhane (1 ml).

25 Point de fusion F : 125-126°C (décomposition)

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 4,85 (m, 2H, -CH₂-N'(Me₂)-) ; 4,75 (s, 2H, -N'(Me₂)-CH₂-C(O)-N<) ; 4,53 (m, 2H, Me₃N' -CH₂-) ; 3,62 (s, 6H, -N'(Me₂)-) ; 3,41 (s, 9H, Me₃N'-) ; 3,30 (m, 4H, -CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,57 (m, 4 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,26 (s, 44 H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

Exemple 9

Lipide cationique pcTG53 de formule I, dans laquelle $R_1=R_2$
= 2-hydroxyéthyle $R_3 = R_4$ = chaîne éthylène ; $m = p = 1$; $R_5 =$
 $(C_{14}H_{29})_2 NC(O)$; $R_6 = H$

5 Une solution de 1,4-bis(2-hydroxyéthyl)pipérazine (0,33 g ;
 1,88 mmole) et de 2-bromo-N,N-ditétradécylacétamide (0,50 g ;
 0,94 mmole) dans l'acétonitrile est agitée pendant 1 h à
 température ambiante. Le mélange est ensuite concentré sous
 pression réduite et le résidu est chromatographié sur colonne de
 10 gel de silice (éluant : méthanol/dichlorométhane 10/90 puis
 15/85) pour donner le produit de monoalkylation (0,67 g) qui est
 repris dans de l'acétonitrile (5 ml) et chauffé à reflux pendant
 4 h en présence d'iodométhane (1 ml). On laisse ensuite
 refroidir, dilue à l'éther et filtre la suspension ainsi
 15 obtenue, ce qui fournit une poudre blanche qu'on lave à l'éther
 et sèche sous vide. Après chromatographie sur colonne de gel de
 silice (éluant : méthanol/dichlorométhane 15/85), on obtient le
 lipide cationique pcTG53 (0,59 g ; 74%) sous forme d'un solide
 blanc.

20 Point de fusion F : 156 -158 °C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 5,21 (s, 2H, N' -CH₂-C(O)-N<);
 4,90-4,10 (m, 16H, -N'(CH₂-CH₂-OH)(CH₂-CH₂)₂N'(Me)CH₂-CH₂-OH) ;
 3,73 et 3,67 (2s, 3H, -N'(Me)-, 2 stéréoisomères) ; 3,31 (m, 4H,
 -CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,58 (m, 4H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,26 (s, 44H, -
 25 CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6H, Me-).

Exemple 10

Lipide cationique pcTG54 de formule I, dans laquelle $R_1 =$
 R_2 = méthyle ;

$R_3 = R_4$ = chaîne éthylène ; $m = p = 1$; $R_5 = (C_{18}H_{35})_2 NC(O)$;
 30 $R_6 = H$

La même procédure que pour le lipide cationique pcTG51 permet la
 préparation du lipide cationique pcTG54 (254 mg; 93%) sous forme
 d'un solide jaunâtre à partir de N,N'-diméthyl-1,4-pipérazine

(66 mg; 0,58 mmole), de 2-iodo-N,N-dioléylacétamide (200 mg; 0,29 mmole) et d'iodométhane (0,5 ml).

Point de fusion F : 155-160 °C (décomposition)

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 5,36 (m, 4 H, -CH=) ; 5,11 (s, 2H, >N+ (Me)CH₂-C(O)-N<) ; 4,82 et 4,60-4,00 (2m, 2H et 6H, Me₂N'(CH₂-CH₂)₂N' (Me)-) ; 3,79 (s, 3 H, >N' (Me)CH₂-C(O)-N<) ; 3,66 et 3,62 (2 s, 6 H, Me₂N+ <) ; 3,33 (m, 4 H, CH₂)₂N-C(O)-) ; 2,02 (m, 8 H, -CH₂-CH=) ; 1,58 (m, 4 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,29 et 1,28 (2 s, 44 H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

10 Exemple 11

Lipide cationique pcTG55 de formule I, dans laquelle R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = méthyle ; m = p = 1 ; R₅ = (C₁₈H₃₅)₂ NC(O) ; R = H

La même procédure que pour le lipide cationique pcTG51 permet la préparation du lipide cationique pcTG55 (248 mg; 91%) sous forme d'une pâte jaunâtre à partir de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (67 mg ; 0,58 mmole), de 2-iodo-N,N-dioléylacétamide (200 mg; 0,29 mmole) et d'iodométhane (0,5 ml).

Point de fusion F : 125-126 °C (décomposition)

20 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,35 (m, 4 H, -CH=) ; 5,12-4,77 (m, 4 H, Me₂N' -CH₂-CH₂-N' (Me)₂-) ; 4,92 (s, 2 H, -N' (Me₂)-CH₂-C(O)-N<) ; 3,79 (s, 6H, -N' (Me₂)-CH₂-C(O)-N<) ; 3,60 (s, 9H, Me₃N'-) ; 3,32 (m, 4H, -CH₂)₂N-C(O)-) ; 2,01 (m, 8H, -CH₂-CH=) ; 1,58 (m, 4 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-) 1,29 et 1,27 (2 s, 44 H, -CH₂-) ; 0,88
25 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

Exemple 12

Lipide cationique pcTG50 dans laquelle R₁ = R₂ = 2 méthyle ; R₃ = R₄ = chaîne éthylène ; m = p = 1 ; R₅ = (C₈H₁₇)₂ NC(O) ; R₆ = H

30 La même procédure que pour le lipide cationique pcTG51 permet la préparation du lipide cationique pcTG50 (0,36 g ; 85%) sous forme d'un solide blanc à partir de N,N'-diméthyl-1,4-pipérazine (0,16 g ; 1,38 mmole), de 2-bromo-N,N-dioctylacétamide (0,25 g ; 0,69 mmole) et d'iodométhane (0,5 ml).

Point de fusion F = 175 °C (décomposition)

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CD₃OD-CF₃CO₂D) : δ 5,04 (s, 2 H, >N'(Me)-CH₂-C(O)-N<) ; 4,72 et 4,50-4,00 (2 m, 2H et 6H, Me₂N'(CH₂-CH₂)₂N'(Me)-) ; 3,74 (s, 3H, >N'(Me)-) ; 3,61 (s, 6H, Me₂N'<) ;
 5 3,27 (m, 4H, -CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,54 (m, 4 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,24 (s, 20 H, -CH₂-) ; 0,84 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

Les composés de départ pour la synthèse des pcTG50 à pcTG55 sont préparés de la façon suivante :

N,N-ditétradécyl-p-toluènesulfonamide

10 Du carbonate de potassium (20,18 g ; 146,00 mmoles) est ajouté à une solution de p-toluènesulfonamide (5,00 g ; 29,20 mmoles) et de 1-bromotétradécane (21,70 ml ; 73,00 mmoles) dans le diméthylformamide (75 ml). La suspension est agitée durant 20 h à reflux; ensuite le milieu réactionnel est refroidi
 15 à température ambiante, dilué avec de l'éther (100 ml) et filtré. Le filtrat est lavé à l'eau (50 ml) et la phase aqueuse est extraite à l'éther (100 ml). Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un solide blanc qui est purifié par
 20 chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane/hexane 40/60) pour donner du N,N-ditétradécyl-p-toluènesulfonamide (15,86 g ; 96%) sous forme d'un solide blanc. Point de fusion F = 54 °C

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 7,68 (d, J = 8,3 Hz, 2 H, H
 25 aromatiques) ; 7,28 (d, J = 8,3 Hz, 2H, H aromatiques) ; 3,08 (t apparent, J = 7,6 Hz, 4H, -CH₂)₂NSO₂-) ; 2,42 (s, 3H, Me-Ar) ; 1,50 (m, 4H, -CH₂-CH₂)₂NSO₂-) ; 1,26 et 1,25 (2 s, 44 H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

Ditétradécylamine

30 Une solution de N,N-ditétradécyl-p-toluènesulfonamide (4,16 g ; 7,38 mmoles) dans le tétrahydrofurane (2 ml) est additionnée à 0°C à une solution de naphthalénure de lithium [préparée à partir de naphthalène (4,73 g ; 36,88 mmoles) et de lithium métallique (0,38 g ; 55,35 mmoles) dans le tétrahydrofurane (40 ml) à

température ambiante pendant 1 h] et le mélange réactionnel est agité pendant 1 h à température ambiante. Du méthanol (2 ml) est ajouté, puis de l'eau (25 ml) et le mélange est extrait à l'éther (2 x 25 ml). La phase organique est séchée sur sulfate
5 de sodium, filtrée et concentrée sous pression réduite pour donner un solide blanc qui est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : éther) pour donner de la ditétradécylamine (2,68 g ; 89%).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 2,58 (t, J = 7,1 Hz, 4H, -CH₂)₂NH-) ;
10 1,48 (m, 5H, -CH₂-CH₂)₂NH-) ; 1,26 (s, 44H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6H, Me-).

2-Bromo-N,N-ditétradécylacétamide

La même procédure que pour le 2-bromo-N,N-dioctylacétamide permet la préparation du 2-bromo-N,N-ditétradécylacétamide (1,28
15 g ; 87%) sous forme d'un liquide jaunâtre, à partir de bromure de bromacétyle (0,29 ml; 3,34 mmoles) et de ditétradécylamine (1,10 g ; 2,78 mmoles).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 3,82 (s, 2H, Br-CH₂-C(O)-) ; 3,30 et
3,26 (2 t, J = 6,8 Hz, 4H, -CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,56 (m, 4H, -CH₂-
20 CH₂)₂NC(O)-) ; 1,25 (s, 44 H, -CH₂-) ; 0,87 (t, J = 6,3 Hz, 6 H, Me-).

Bromure d'oléyle

De la triphénylphosphine (2,52 g; 9,62 mmoles) est ajoutée par petites portions à une solution vigoureusement agitée d'alcool
25 oléique (1,00 g; 3,72 mmoles ; Fluka 99%) et de tétrabromométhane (1,61 g ; 4,84 mmoles) dans l'acétonitrile (15 ml) à 0 °C. Le milieu hétérogène est agité pendant 1 h à température ambiante. Le surnageant est ensuite transvasé dans un ballon et la pâte résiduelle est triturée avec de l'éther
30 (10 ml), puis filtrée. Les solutions organiques combinées sont concentrées sous pression réduite pour donner une huile incolore qui est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : hexane) pour donner le bromure d'oléyle (1,21 g; 98%) sous forme d'une huile incolore.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,35 (m, 2H, -CH=); 3,41 (t, J = 6,8 Hz, 2H, -CH₂-Br) ; 2,02 (m, 4H, -CH₂-CH=) ; 1,86 (quint., J = 6,8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-Br) ; 1,42 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-Br) ; 1,30 et 1,28 (2 s, 20H, -CH₂-) ; 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 3 H, Me-).

5 N,N-dioléyl-p-toluènesulfonamide

La même procédure que pour le N,N-ditétradécyl-p-toluène sulfonamide permet la préparation du N,N-dioléyl-p-toluènesulfonamide (0,83 g ; 87%) à partir de bromure d'oléyle (1,20 g ; 3,62 mmoles), de p-toluènesulfonamide (0,28 g ; 1,65 mmole) et de carbonate de potassium (1,14 g ; 8,25 mmoles)

10 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 7,68 (d, J = 8,2 Hz, 2 H, H aromatiques) ; 7,28 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H aromatiques) ; 5,35 (m, 4 H, -CH=) ; 3,08 (t apparent, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂)₂NSO₂-) ; 2,42 (s, 3 H, Me-Ar-) ; 2,01 (m, 8H, -CH₂-CH=) ; 1,50 (m, 4 H, -CH₂-CH₂)₂NSO₂-) ; 1,27 (s, 44 H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,3 Hz, 6 H, Me-).

Dioléylamine

La même procédure que pour la ditétradécylamine permet la préparation de la dioléylamine (0,55 g ; 71%) sous forme d'une huile jaunâtre, à partir de N,N-dioléyl-p-toluènesulfonamide (1,00 g ; 1,49 mmoles), de naphthalène (0,95 g ; 7,44 mmoles) et de lithium métallique (0,08 g ; 11,18 mmoles).

25 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,35 (m, 4H, -CH=) ; 2,58 (t, J = 7,1 Hz, 4H, -CH₂)₂NH-) ; 2,01 (m, 8H, -CH₂-CH=) ; 1,48 (m, 5H, -CH₂-CH₂)₂NH-) ; 1,29 et 1,28 (2 s, 44H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6H, Me-).

2-Bromo-N,N-dioléylacétamide

La même procédure que pour le 2-bromo-N,N-dioctylacétamide permet la préparation du 2-bromo-N,N-dioléylacétamide (0,83 g ; 82%) sous forme d'un liquide jaunâtre, à partir du bromure de bromacétyl (0,17 ml ; 1,89 mmole) et de dioléylamine (0,82 g ; 1,58 mmole).

40

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,30 (m, 4H, -CH=) ; 3,78 (s, 2H, Br-CH₂-C(O)-) ; 3,26 et 3,22 (2 t, J = 7,0 Hz, 4H, -CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,96 (m, 8 H ; -CH₂-CH=) ; 1,54 (m, 4 H, -CH₂-CH₂)₂NC(O)-) ; 1,25 et 1,24 (2 s, 44 H, -CH₂-) ; 0,83 (t, J = 6,3 Hz, 6 H, Me-).

5 2-Iodo-N,N-dioléylacétamide

Une solution de 2-bromo-N,N-dioléylacétamide (0,81 g ; 1,27 mmole) et d'iodure de sodium (0,76 g ; 5,08 mmoles) dans l'acétone est chauffée au reflux pendant une nuit. De l'hexane (10 ml) est ajouté et le précipité est filtré pour donner, après évaporation du filtrat sous pression réduite, le 2-iodo-N,N-dioléylacétamide (0,87 g ; 100%) sous forme d'un liquide jaunâtre.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,32 (m, 4H, -CH=) ; 3,71 (s, 2H ; I-CH₂-C(O)-) 3,30 et 3,23 (2 t, J = 7,4 Hz, 4H, -CH₂)₂N-C(O)-) ; 2,02 (m, 8H, -CH₂-CH=) ; 1,56 (m, 4H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-) ; 1,31 et 1,29 (2 s, 44 H, -CH₂-) ; 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 6 H, Me-).

Préparation des complexes lipides-ADN par mise en suspension dans l'éthanol

20 1. Préparation des complexes lipides pcTG24, éventuellement DOPE, -ADN rapport de charges +/- = 10

Les quantités de lipides sont calculées en se basant sur la concentration d'ADN final (0,1 mg/ml pour les essais in vitro), le rapport de charges désiré, la masse molaire du lipide, le nombre de charges positives du lipide cationique choisi et le volume final désiré. A titre d'exemple, pour obtenir 0,5 ml d'un complexe entre pcTG24/DOPE et de l'ADN plasmidique à un rapport de charges de 10 entre les charges positives apportées par le lipide cationique et les charges négatives apportées par l'ADN à une concentration d'ADN finale de 0,1 mg/ml, on mélange les différents ingrédients selon le calcul le suivant :

0,1 mg d'ADN/ml soit (0,1/330) mmoles de charges négatives (330Da est le poids moléculaire moyen d'un nucléotide) par ml correspondent à 0,30 μmole/ml de charges négatives ou 0,15 μmole de charges négatives pour 0,5 ml. Pour obtenir 10 fois plus de

charges positives, il faut une concentration de 3,0 $\mu\text{mole/ml}$ de charges positives apportées par le lipide cationique (1,5 μmole pour 0,5 ml). La masse molaire de pcTG24 sous forme de sel d'iodure est de 905 g/mole et la molécule contient 2 charges positives.

Donc il faut 0,75 $\mu\text{mole/ml}$ de pcTG24 ce qui correspond à 0,68 mg/ml. Pour avoir un léger excès, on prépare une suspension à partir de 1,0 μmole (0,9 mg) de pcTG24. Pour obtenir une concentration équimolaire en L- α -Dioleoyl-phosphatidyléthanolamine (DOPE, 744 g/mole, Sigma ; P0510) il en faut 0,74 mg/ml dans la préparation lipidique. Les quantités et les concentrations pour les autres composés sont ajustées en conséquence de leurs masses molaires respectives et de leur nombre de charges positives.

Le mélange des lipides se fait à partir des solutions dans du chloroforme/méthanol (v:v). Les lipides cationiques sont pesés et la quantité de DOPE est ajoutée à partir d'une solution de 10 ou 20 mg/ml dans le chloroforme dans un tube en verre, stérilisé à l'alcool et aux UV, pour obtenir une concentration de 2mM en lipide cationique (4 mM en lipide total). Les solvants sont évaporés sous vide ($0,2 \cdot 10^5$ Pa (200 bars)) pendant 45 min à 45°C en utilisant un vortex de 40 tours par minute (Labconco, Rapidvap, Uniequip, Martinsried, Allemagne). Le film lipidique est repris dans 18 μl d'éthanol pour être à la concentration de 50 mg/ml en lipide cationique.

Cette solution est complétée avec 162 μl d'HEPES 20 mM pH 7,5 (ajusté avec NaOH) pour préparer une solution à 5 mg/ml finale en lipide cationique.

L'ADN plasmidique est préparé à partir d'une solution mère à 1 mg/ml (dans du Tris 10 mM, EDTA, 1 mM, pH 7,5).

Pour une solution de 0,5 ml finale, on prélève 50 μl de la solution mère (50 μg ADN) auxquels on ajoute 313 μl d'HEPES 20 mM pH 7,5.

Pour complexer l'ADN avec des préparations lipidiques, on ajoute des lipides sur l'ADN. La suspension est mélangée 10 fois par aspiration/refoulement. Les complexes sont conservés à + 4°C.

137 µl de pcTG24/DOPE sont ajoutés à 363 µl de la solution
5 d'ADN pour obtenir 0,5 ml de complexe à 0,1 mg/ml ADN et un rapport de charges de 10.

La préparation des complexes se fait sous une hotte à flux laminaire. Lors des autres étapes, il faut aussi éviter toutes contaminations.

10 2. Préparation des complexes lipides pcTG42, éventuellement DOPE, -ADN dans un rapport de charges +/- = 10

Les quantités de lipides sont calculées en se basant sur la concentration d'ADN final (0,1 mg/ml pour les essais *in vitro*), le rapport de charges désiré, la masse molaire du lipide, le
15 nombre de charges positives du lipide cationique choisi et le volume final désiré (0,5 ml). A titre d'exemple, pour obtenir 0,5 ml d'un complexe entre pcTG42/DOPE et de l'ADN plasmidique à un rapport de 10 entre les charges positives apportées par le lipide cationique et les charges négatives apportées par l'ADN à
20 une concentration d'ADN finale de 0,1 mg/ml, le calcul est le suivant :

0,1mg d'ADN/ml soit (0,1/330) mmoles de charges négatives (330 Da est le poids moléculaire moyen d'un nucléotide) par ml correspondent à 0,30 µmole/ml de charges négatives ou 0,15 µmole
25 de charges négatives pour 0,5 ml. Pour obtenir 10 fois plus de charges positives, il faut une concentration de 3,0 µmole/ml de charges positives apportées par le lipide cationique (1,5 µmole pour 0,5 ml). La masse molaire de pcTG42 sous forme de sel de bromure est de 841 g/mole et la molécule contient 2 charges
30 positives. Donc il faut 0,75 µmole de pcTG42 ce qui correspond à 0,63 mg/ml. Pour avoir un léger excès, on prépare une suspension à partir de 1,0 µmole (0,84 g) de pcTG42.

Une concentration équimolaire en DOPE, (744 g/mole, Sigma ; P0510) correspond à 0,74 mg dans la préparation lipidique.

Le mélange des lipides se fait comme précédemment. Le film lipidique est repris dans 17 µl d'éthanol afin d'ajuster la concentration à 50 mg/ml en lipide cationique.

Cette solution est complétée avec 153 µl d'HEPES 20mM pH 7,5 (ajusté avec NaOH) pour préparer une solution à 5 mg/ml finale en lipide cationique.

50 µg d'ADN plasmidique correspondant à 50 µl d'une solution mère à 1 mg/ml (dans du Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,5) sont dilués dans 322 µl d'HEPES 20 mM pH 7,5.

128 µl de pcTG42/DOPE sont ajoutés aux 372 µl de la solution d'ADN pour obtenir 0,5 ml de complexe à 0,1 mg/ml d'ADN et un rapport de charges de 10. La suspension est mélangée par aspiration/refoulement à la pipette (10 fois). Les complexes sont conservés à + 4°C.

Préparation des complexes lipides-ADN par mise en suspension dans une solution de détergent

Les quantités de lipides sont calculées comme décrit ci-dessus pour 0,5 ml final en se basant sur la concentration d'ADN final (0,1 mg/ml pour les essais *in vitro*), le rapport de charges désiré, la masse molaire de lipide cationique et le nombre de charges positives du lipide cationique choisi. Le mélange des lipides se fait dans un tube en verre, stérilisé à l'alcool et aux UV, pour obtenir une solution 2mM en lipide cationique (voir ci-dessus). Les solvants sont évaporés et le film lipidique est repris dans une solution de n-octyl β-D-glucopyranoside (octylglucoside, Sigma, O 9882) dans un rapport lipide cationique/détergent de 1/5 (mole:mole).

Par exemple, d'une solution d'octylglucoside 20mM dans de l'HEPES 20mM pH 7,5, on prélève pour 1 µmole de pcTG24 ou pcTG42/DOPE 250 µl avec lesquels on reprend le film de mélange lipidique. 50 µg d'ADN plasmidique correspondant à 50 µl d'une solution mère à 1 mg/ml (dans du Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) sont prélevés et ajoutés à 212,5 µl d'HEPES 20mM pH 7,5. 187,5 µl de la suspension lipidique sont ajoutés sur l'ADN en

aspirant et refoulant 10 fois à la pipette pour obtenir la suspension finale à 0,1 mg/ml d'ADN et un rapport de charges +/- de 10. Pour éliminer le détergent, une dialyse de 3 fois 4 heures à température ambiante contre de l'HEPES 20mM pH 7,5 est
5 entreprise dans des microdoigts de dialyse (seuil d'exclusion de 13,2 kD ; Sartorius, Göttingen, Allemagne). Les complexes ADN/lipides dialysés sont conservés à + 4°C. La préparation se fait dans une hotte à flux laminaire.

10 Préparation des complexes lipides-ADN par sonication-extrusion

Les quantités de lipides sont calculées comme décrit ci-dessus pour 0,5 ml final en se basant sur la concentration d'ADN final (0,1 mg/ml pour les essais *in vitro*), le rapport de charges désiré, la masse molaire de lipide cationique et le nombre de
15 charges positives du lipide cationique choisi. Le mélange des lipides se fait dans un tube en verre, stérilisé à l'alcool et aux UV, pour obtenir une solution 2mM en lipide cationique comme indiqué ci-dessus. Les solvants sont évaporés et le film lipidique est repris dans 600 µl d'HEPES 20 mM pH 7,5 à 4°C
20 pendant environ 16 h. La suspension est soniquée dans un bain de sonication (Branson 221) jusqu'à homogénéité visuelle. La suspension lipidique est extrudée au travers de deux membranes de 0,2 µm de diamètre de pores (Nucleopore, Costar, Cambridge, MA, USA) et rincée avec de l'HEPES 20mM pH 7,5 (Extruder de
25 Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) à une pression maximale de $50 \cdot 10^5$ Pa (50 bars). La suspension lipidique est maintenue à température ambiante pendant 1 heure. 450 µl de la suspension lipidique sont ajoutés sur 50 µl d'une solution mère de l'ADN plasmidique (1 mg/ml) et mélangés en aspirant/refoulant 10 fois
30 à la pipette. Les complexes lipides/ADN sont conservés à + 4°C. Les préparations sont faites sous une hotte à flux laminaire.

Protocole d'évaluation de la complexation de l'ADN par les lipides

Un gel à 1% (w:v) agarose est préparé dans un tampon TAE (TAE : Tris 4,86 g/l + acétate de sodium 0,68 g/l + EDTA 0,336g/l pH 7,8). Si nécessaire, l'échantillon est dilué dans du TAE puis on ajoute le tampon d'échantillon (bleu de bromophénol 0,083 %, cyanol xylène FF 0,083 %, glycérol dans l'eau 10%) de façon se trouver à 50 ng d'ADN/ μ l. L'échantillon est brièvement vortexé et laissé 30 min à température ambiante. Le plasmide non complexé est préparé comme témoin à la même concentration. 10 μ l (500 ng d'ADN) sont déposés sur le gel et la migration s'effectue à 60mV pendant 3 heures. Le gel est révélé dans du TAE contenant 0,006% (v:v) de bromure d'éthidium à 10 mg/ml pendant au moins 30 min. Ensuite le gel est rincé dans du TAE et analysé sous UV.

Protocole de mesure de la taille des particules par diffusion quasi-élastique de la lumière

Les analyses sont faites sur un Coulter N4Plus (Coultronics France S.A., Margency, France) à 25°C après équilibration de l'échantillon pendant 20 min. Une aliquote de l'échantillon est aspirée et refoulée plusieurs fois avant d'être pipetée. L'échantillon est dilué dans la cuve de mesure et homogénéisé. La mesure de la lumière diffractée à 90° est faite pendant 180 sec après 180 sec d'attente. La gamme utilisée va de 3 nm à 10 000 nm en utilisant 31 bins. Pour être valable, l'échantillon doit donner entre 50 000 et 1 000 000 counts/sec.

Caractéristiques physico-chimiques

Les trois méthodes de formulation "injection d'éthanol", et "dialyse de détergent" «sonication-extrusion» sont appliquées aux lipides cationiques selon l'invention avec ou sans des quantités équimoléculaires de DOPE à des rapports de charges d'environ 10 ou 5. Les formulations appropriées sont sélectionnées pour les études de reproductibilité basées sur le

fait que l'ADN est complètement complexé (aucune migration dans le gel d'agarose) et que les complexes présentent des diamètres de particules comme déterminé par diffusion quasi élastique de la lumière permettant une administration *in vivo*.

- 5 De manière générale, tous les complexes ADN/lipide testés (à base de pcTG24, pcTG42, pcTG52, pcTG54 ou pcTG55) complexent l'ADN complètement et ceci en présence ou en absence de DOPE.

Par ailleurs, la formulation par mise en suspension dans l'éthanol s'avère avantageuse pour générer des complexes de
10 petite taille (inférieure à 500 nm) particulièrement appropriés en vue d'une administration *in vivo* et ceci avec tous les lipides testés.

A titre d'exemples, des complexes de diamètre inférieur ou d'environ 200 nm sont obtenus dans les cas suivants :

- 15 ADN/pcTG24/DOPE pour un rapport de charge $R = 5$
ADN/pcTG42 pour un rapport de charge $R = 10$
ADN/pcTG42/DOPE pour un rapport de charge $R = 10$ ou 5
ADN/pcTG52/DOPE pour un rapport de charge $R = 5$ ou 10
ADN/pcTG54/DOPE pour un rapport de charge $R = 5$ ou 10
20 ADN/pcTG55 pour un rapport de charge $R = 10$.

Les complexes à base de lipide pcTG42 produits par les différentes méthodes de formulation ont été évalués. On obtient des complexes d'une taille inférieure ou proche de 200 nm pour les compositions ADN/pcTG42 à un rapport de charge $R = 10$
25 préparées par mise en suspension dans une solution de n-octyl β -D-glucopyranoside et ADN/pcTG42/DOPE à un rapport de charge $R = 10$ obtenues par sonication.

Transfection *in vitro* de cellules satellites

Le plasmide rapporteur pTG11033 est utilisé pour évaluer
30 l'efficacité transfectionnelle des composés de l'invention. Il comporte le promoteur CMV dirigeant l'expression du gène luciférase.

Des cultures de muscles de chien et de muscles humains sont effectuées dans un milieu HamF 14 (Life Technologies) supplémenté avec 10 % de sérum foetal de veau (FCS, Hyclone, Logan, UT), 10 µg/ml d'insuline (Sigma), 10 ng/ml d'EGF (Sigma) et de FGF basique (Pepro Tech Inc, Rocky Hill, NJ) 2mM de glutamine (bioMérieux), et 40 µg/ml de gentamycine (Schering Plough).

Les cellules sontensemencées 24 h à 48 h avant la transfection, dans une boîte de cellules à 96 puits à raison de $5 \cdot 10^3$ à 10^4 cellules par puits, à environ 30 % de confluence, et maintenues à 37°C en atmosphère contenant 5 % CO₂ et 95 % d'air.

Les transfections sont effectuées avec des mélanges de quantités variables de lipides et d'ADN plasmidique pour déterminer les rapports de charges ioniques et les concentrations d'ADN optimales par puits.

Les complexes utilisés sont préparés 24 h à 48 h avant la transfection et dilués dans le milieu HamF 14 contenant 40 µg/ml de gentamycine et 2mM de la glutamine en présence ou non de 10 % de FCS.

Après élimination du milieu de culture, 100 µl de mélanges de transfection sont transférés dans chacun des puits.

Après 4 heures à 37°C, tous les milieux de transfection sont alors ajustés à 10 % de FCS ou (FCS + Plasma), 10 µg/ml d'insuline (Sigma), 10 ng/ml d'EGF (Sigma) et de FGF basique (Pepro Tech Inc, Rocky Hill, NJ), de la glutamine 2mM (bioMérieux), et 40 µg/ml de gentamycine (Schering Plough) pour un volume final de 250 µl. Les cultures sont incubées pendant 48 h puis les cellules sont récupérées et testées pour leur capacité à exprimer le gène de la luciférase.

Transfection de cellules A549

Les cellules A549 (cellules épithéliales dérivées de carcinome pulmonaire humain) sont mises en culture dans du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% de sérum de veau foetal (Gibco BRL) 24 heures avant le début de la transfection

dans des plaques de 96 puits (2×10^4 cellules par puits) dans une atmosphère humide à 37°C et 5% CO_2 /95% air. Pour la transfection en l'absence de sérum, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu sans sérum. On prépare dans une autre

5 microplaque les suspensions de complexes lipides/ADN suivantes (complexes lipides/ADN à 0,1 mg/ml d'ADN et au rapport de charges indiqué) : 44 μl (4,4 μg d'ADN), 22 μl (2,2 μg d'ADN), 5,5 μl (0,55 μg d'ADN) de solution stock dans les 3 premiers puits, et 11 μl (0,11 μg d'ADN) de la solution stock diluée 10

10 fois dans le puits suivant. Le volume est complété à 110 μl avec du DMEM et 100 μl sont transférés sur les cellules A549. L'incubation se fait avec 4, 2, 0.5 et 0,1 μg d'ADN par puits pendant 4 heures. 50 μl de DMEM + 30% de sérum de veau foetal sont ajoutés 4 heures après le début de la transfection.

15 Finalement 100 μl de DMEM + 10% de sérum de veau foetal sont ajoutés 24 heures après le début de la transfection. Les transfections en présence de 10% de sérum de veau foetal sont réalisées d'une façon identique sauf que la transfection se passe dans du milieu avec sérum.

20 Analyse de la transfection

48 h après la transfection, le milieu est éliminé et les cellules sont lavées avec 100 μl de solution phosphate PBS et lysées avec 50 μl de tampon de lyse (Promega). Les lysats sont congelés à -80 °C jusqu'à la mesure de l'activité en luciférase.

25 Celle-ci se fait sur 20 μl de mélange pendant une minute en utilisant le système de détermination de la luciférase (Promega) (luminomètre LB96P Berthold) dans des plaques à 96 puits en mode cinétique.

Résultats des essais de transfection

30 Les préparations à base de pCTG24 et pCTG42 en présence ou non de DOPE ont été évaluées en transfection *in vitro* en utilisant les cellules A549 et les cellules satellites primaires de chien. On évalue les unités relatives de lumière (RLU) par puits en faisant varier la quantité d'ADN par puits (4, 2, 0,5 et 0,1 μg)

et les conditions expérimentales (transfection en présence ou en absence de sérum).

- La transfection des cellules pulmonaires A549 avec les complexes pTG11033/pcTG24 permet des niveaux d'expression du gène luciférase importants ; notamment à faible concentration d'ADN (0,1 µg) et en absence de sérum. La présence de DOPE dans les préparations augmente l'activité transfectionnelle permettant d'inclure des quantités plus importantes d'ADN dans les complexes (0,1 à 0,5 µg) et du sérum pendant la transfection.
- De même, les complexes pTG11033/pcTG42 sont capables de transfecter les cellules A549. L'expression du gène luciférase est la plus élevée à faible concentration d'ADN (0,1 µg). On n'observe pas ou peu de différence significative dépendante des conditions expérimentales de transfection (avec ou sans sérum).
- L'efficacité transfectionnelle est augmentée lorsque la préparation contient de la DOPE. Cet effet est encore plus bénéfique lorsque la transfection est réalisée en présence de sérum.
- Les complexes ADN/pcTG42/DOPE conviennent tout particulièrement à la transfection de cellules musculaires. Des niveaux d'expression luciférase élevés sont obtenus à faible concentration d'ADN (0,1 µg).

Exemple 13: Préparation d'isomères cis et trans de lipides cationiques centrés sur un motif pipérazine ou homopipérazine

Diamide ANI 181

- Une solution de 2-bromo-N,N-dioctylacétamide (1,05 g; 2,90 mmoles) dans un mélange de THF et d'acétonitrile (1/1; v/v; 5 ml) est ajoutée lentement à une solution de pipérazine (0,125 g; 1,45 mmole) et de diisopropyléthylamine (0,187 g; 2,90 mmoles) dans l'acétonitrile (20 ml). Le mélange hétérogène jaunâtre est agité pendant 4 h à 0°C, puis dilué avec de l'éther et lavé avec une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, concentrée sous

pression réduite et purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol/ dichlorométhane 5/95) pour donner le diamide ANI 181 (0,852 g; 91%) sous forme d'une huile incolore.

- 5 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 3,27 (t, J = 7,4 Hz, 8 H, -CH₂)₂N-C(O)-); 3,14 (s, 4 H, N-CH₂-C(O)-); 2,55 (s, 8 H, -N(CH₂-CH₂)₂N-); 1,52 (m, 8 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-); 1,28 et 1,26 (2 s, 40 H, -CH₂-); 0,89 et 0,87 (2 t, J = 6,6 Hz, 12 H, Me-).

Diamide ANII 21

- 10 La même procédure que pour le diamide ANI 181 permet la préparation du diamide ANII 21 (545 mg; 92%) sous forme d'une huile incolore à partir de 2-bromo-N,N-dioctylacétamide (650 mg; 1,79 mmole) et d'homopipérazine (90 mg; 0,89 mmole) en présence de diisopropyléthylamine (232 mg; 1,79 mmole).

- 15 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 3,30 (s, 4 H, N-CH₂-C(O)-), 3,30 et 3,26 (2 t, J = 8 Hz, 8 H, -CH₂)₂N-C(O)-); 2,76 (t et s, J = 5,5 Hz, 8 H, N-CH₂-CH₂-CH₂-N et N-CH₂-CH₂-N); 1,82 (quint., 2 H, J = 5,5 Hz, N-CH₂-CH₂-CH₂-N); 1,51 (m, 8 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-); 1,27 et 1,25 (2 s, 40 H, -CH₂-); 0,88 et 0,86 (2 t, J = 6,7 Hz, 12 H, Me-).

2-Bromoacétate d'oléyle

- Une solution de bromure de bromoacétyle (0,49 ml ; 5,65 mmoles) dans le tétrahydrofurane (12 ml) est additionnée, à 0°C, à un mélange d'alcool oléique (1,00 ml ; 3,77 mmoles) et de
25 diisopropyléthylamine (0,88 g ; 5,65 mmoles) dans le tétrahydrofurane (38 ml). Le mélange est agité 2 h à 0°C, puis 1 h à température ambiante; il est ensuite lavé avec une solution 1 N d'acide chlorhydrique (20 ml) laquelle est extraite avec de l'éther (50 ml). Les phases organiques combinées sont
30 lavées avec une solution saturée de carbonate de sodium (20 ml), séchées sur sulfate de sodium, concentrées sous pression réduite et purifiées par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : hexane/éther 99/1) pour donner du 2-bromoacétate d'oléyle (1,31 g ; 89%) sous forme d'une huile incolore.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,34 (m, 2 H, -CH=); 4,16 (t, J = 6,6 Hz, 2 H, -CH₂-O-C(O)-); 3,82 (s, 2 H, BrCH₂-C(O)-); 2,00 (m, 4 H, -CH₂-CH=); 1,67 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-O-C(O)-); 1,30 et 1,26 (2 s, 22 H, -CH₃-); 0,87 (t, J = 6,3 Hz, 3 H, Me-).

5 Lipides cationiques isomères ANII 16 F1 et ANII 16 F2

De l'iodométhane (1 ml) est additionné à une solution de diamide ANI 181 (316 mg, 0,49 mmole) dans l'acétonitrile (5 ml) et le mélange est chauffé au reflux pendant 4 h. Après refroidissement, la solution est concentrée sous pression
10 réduite et le brut réactionnel jaunâtre est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : éther/dichlorométhane/méthanol 60/35/5 puis dichlorométhane/méthanol 85/15) pour donner deux lipides cationiques isomères ANII 16 F1 (142 mg; 31%) et ANII 16 F2 (245
15 mg; 54%).

ANII 16 F1 : F = 148 °C. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 5,09 (s large, 4 H, N'-CH₂-C(O)-); 4,79 et 4,50 (2 d larges, J = 11 Hz, 8 H, -CH₂-N'); 3,85 (s, 6 H, Me-N'); 3,31 (m, 8 H, -CH₂)₂N-C(O)-); 1,58 (m, 8 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-); 1,27 (s large, 40 H, -CH₃-); 0,88 (t, J = 6,3 Hz, 12 H, Me-).
20

ANII 16 F2 : F = 143°C. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 5,21 (s large, 4 H, N'-CH₂-C(O)-); 5,00-4,80 et 4,60-4,40 (2 m, 8 H, -CH₂-N'); 3,82 (s, 6 H, Me-N'); 3,33 (m, 8 H, -CH₂)₂N-C(O)-); 1,60 (m, 8 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-); 1,27 (s large, 40 H, -CH₃-); 0,88
25 (t, J = 6,3 Hz, 12 H, Me-).

Lipides cationiques isomères ANII 22 F1 et ANII 22 F2

La même procédure que pour les lipides cationiques ANII 16 permet la préparation des lipides cationiques ANII 22 F1 (168 mg; 29%) et ANII 22 F2 (255 mg; 45%) à partir du diamide ANII 21
30 (400 mg; 0,603 mmole) et d'iodométhane (1 ml).

ANII 22 F1 : F = 144-145°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 5,05-4,10 (m, 12 H, N'-CH₂-C(O)- et -CH₂-N'); 3,62 (s, 6 H, Me-N'); 3,29 (m, 8 H, -CH₂)₂N-C(O)-); 2,78 (m, 2 H, -N'-CH₂-CH₂-CH₂-N'-), 1,57 (m, 8 H, -CH₂-

$\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$; 1,28 (s large, 40 H, $-\text{CH}_2-$); 0,88 (t, $J = 6,3$ Hz, 12 H, Me-).

ANII 22 F2 : 122-124°C.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 - $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) : δ 5,10-4,25 (m, 12 H, $\text{N}'-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ et $-\text{CH}_2-\text{N}'$); 3,65 (s, 6 H, Me- N'); 3,30 (m, 8 H, $(\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 2,75 (m, 2 H, $-\text{N}'-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}'-$), 1,58 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 1,27 (s large, 40 H, $-\text{CH}_2-$); 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz, 12 H, Me-).

Lipides cationiques isomères ANII 39 F1 et ANII 39 F2

10 Une solution de N,N'-diméthyl-1,4-pipérazine (26 mg ; 0,226 mmole) et de 2-bromoacétate d'oléyle (220 mg ; 0,565 mmole) dans l'acétonitrile (5 ml) est chauffée à reflux pendant 16 h. La solution est concentrée sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant
15 : acétate d'éthyle/dichlorométhane/méthanol 40/45/15 puis 40/40/20) pour donner les deux lipides cationiques isomères ANII 39 F1 (75 mg ; 37%) et ANII 39 F2 (40 mg ; 20%).

ANII 39 F1 : F = 173-175°C.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 - $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) : δ 5,36 (m, 4 H, $-\text{CH}=\text{}$); 4,79 (s
20 large, 4 H, $\text{N}'-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$); 4,65 et 4,35 (2 d larges, $J = 11$ Hz, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{N}'$); 4,26 (t, $J = 6,8$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 3,74 (s, 6 H, Me- N'); 2,02 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$); 1,68 (m, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 1,29 (s large, 40 H, $-\text{CH}_2-$); 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz, 6 H, Me-)

25 ANII 39 F2 : F = 163-165°C.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 - $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) : δ 5,36 (m, 4 H, $-\text{CH}=\text{}$); 4,84 (s,
4 H, $\text{N}'-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$); 4,70-4,30 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{N}'$); 4,25 (t, $J = 6,9$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 3,75 (s, 6 H, Me- N'); 2,02 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$); 1,67 (m, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 1,29 et 1,27 (2 s, 40 H,
30 $-\text{CH}_2-$); 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz, 6 H, Me-)

Diamide ANII 151

La même procédure que pour le diamide ANI 181 permet la préparation du diamide ANII 151 (197 mg; 84%) sous forme d'une huile incolore à partir de 2-bromo-N,N-di(tétradécyl)acétamide

(310 mg; 0,584 mmole) et d'homopipérazine (23 mg; 0,23 mmole) en présence de diisopropyléthylamine (60 mg; 0,47 mmole).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 3,30 (s, 4 H, N-CH₂-C(O)-), 3,28 (m, 8 H, -CH₂)₂N-C(O)-; 2,77 (m, 8 H, N-CH₂-CH₂-CH₂-N et N-CH₂-CH₂-N); 1,82 (m, 2 H, N-CH₂-CH₂-CH₂-N); 1,53 (m, 8 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-; 1,26 et 1,25 (2 s, 88 H, -CH₂-); 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 12 H, Me).

Lipides cationiques isomères ANII 152 F1 et ANII 152 F2

La même procédure que pour les lipides cationiques ANII 16 permet la préparation des lipides cationiques ANII 152 F1 (58 mg; 30%) et ANII 152 F2 (84 mg; 44%) à partir du diamide ANII 151 (150 mg; 0,150 mmole) et d'iodométhane (1 ml).

ANII 152 F1 : F = 130°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 5,15-4,30 (m, 12 H, N'-CH₂-C(O)- et -CH₂-N'); 3,70 (s large, 6 H, Me-N'); 3,30 (m, 8 H, -CH₂)₂N-C(O)-; 2,81 (m, 2 H, -N'-CH₂-CH₂-CH₂-N'-), 1,59 (m, 8 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-; 1,26 (s large, 88 H, -CH₂-); 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 12 H, Me-).

ANII 152 F2 : F = 118°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 5,20-4,20 (m, 12 H, N'-CH₂-C(O)- et -CH₂-N'); 3,67 (s large, 6 H, Me-N'); 3,30 (m, 8 H, -CH₂)₂N-C(O)-; 2,86 (m, 2 H, -N'-CH₂-CH₂-CH₂-N'-), 1,57 (m, 8 H, -CH₂-CH₂)₂N-C(O)-; 1,25 (s large, 88 H, -CH₂-); 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 12 H, Me-).

Lipides cationiques isomères ANII 150 F1 et ANII 150 F2

La même procédure que pour les lipides cationiques ANII 39 permet la préparation des lipides cationiques ANII 150 F1 (61 mg; 31%) et ANII 150 F2 (37 mg; 19%) à partir de 2-bromo-N,N-di(tétradécyl)acétamide (220 mg; 0,415 mmole) et de N,N'-diméthyl-1,4-pipérazine (19 mg; 0,17 mmole).

ANII 150 F1 : F = 111°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃CO₂D) : δ 4,88 (s large, 4 H, N'-CH₂-C(O)-); 4,70 et 4,39 (2 m, 8 H, -CH₂-N'); 3,73 (s, 6 H, Me-N');

3,28 (m, 8 H, $-\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 1,56 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$);
1,26 (s large, 88 H, $-\text{CH}_2-$); 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 12 H, Me-).

ANII 150 F2 : F = 100-102°C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3 - $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) : δ 5,02 (s large, 4 H, $\text{N}'-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$); 4,90-4,65 et 4,50-4,25 (2 m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{N}'$); 3,71 (s, 6 H, Me- N'); 3,29 (m, 8 H, $-\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 1,56 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 1,25 (s large, 88 H, $-\text{CH}_2-$); 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 12 H, Me-).

Lipides cationiques isomères ANII 157 F1 et ANII 157 F2

La même procédure que pour les lipides cationiques ANII 39 permet la préparation des lipides cationiques ANII 157 F1 (65 mg; 33%) et ANII 157 F2 (22 mg; 11%) à partir du 2-bromo-N,N-dioléylacétamide (136 mg; 0,211 mmole) et de la N,N'-diméthyl-1,4-pipérazine (16 mg; 0,14 mmole).

ANII 157 F1 :

RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3) : δ 5,48-5,30 (m, 12 H, $-\text{CH}=\text{}$ et $\text{N}'-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$); 4,95 et 4,74 (2 m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{N}'$); 4,03 (s large, 6 H, Me- N'); 3,29 (m, 8 H, $-\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 2,01 (m, 16 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$); 1,53 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 1,28 et 1,27 (2 s larges, 88 H, $-\text{CH}_2-$); 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 12 H, Me-)

ANII 157 F2 :

RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3) : δ 5,45 (m, 4 H, $\text{N}'-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$); 5,34 (m, 8 H, $-\text{CH}=\text{}$); 5,09 et 4,66 (2 m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{N}^+$); 3,99 (s large, 6 H, Me- N'); 3,25 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 2,00 (m, 16 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$); 1,52 (m, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}(\text{O})-$); 1,27 (s large, 88 H, $-\text{CH}_2-$); 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 12 H, Me-).

Exemple 14

Analyse de nouveaux complexes lipidiques

1. Formulation des complexes ADN/lipide cationique par mélange avec un solvant

Les quantités requises de chacun des lipides cationiques sont mesurées et dissoutes dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (v/v : 1/1). Si nécessaire, une quantité équimolaire de DOPE (Avanti Polar

Lipids, Alabaster, AL) est ajoutée à partir d'une évaporation (Labconco Rapidvap Model 79000 ; UniEquip) à 45°C, 40rpm durant 45 minutes sous vide. Le film lipidique obtenu est resolubilisé pour obtenir une concentration lipidique totale de 50 mg/ml dans un mélange éthanol/DMSO (v/v : 1/1). La suspension lipidique est ensuite rapidement mélangée avec 20 mM HEPES, pH 7.5 afin d'obtenir une concentration finale en lipide de 5 mg/ml. La formation des complexes avec l'ADN plasmidique purifié, une préparation à 1 mg/ml de plasmide dans du TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.5) est diluée avec 20 mM HEPES, pH 7.5 afin d'obtenir la concentration désirée et additionnée de suspension lipidique telle que décrite auparavant afin d'atteindre une concentration en ADN de 0.1 mg/ml au rapport de charges souhaité. Par ailleurs, afin d'obtenir des complexes de petites tailles et afin d'éviter les problèmes de précipitation, il est important de mélanger les composés rapidement par aspiration/propulsion à l'aide des pipettes. Toutes les préparations sont conservées à 4°C avant leur utilisation.

2. Formulation des complexes ADN/lipide cationique par mélange avec un détergent et dialyse

Les quantités de lipide sont calculées afin d'obtenir des complexes ADN/liide à 0.1 mg d'ADN/ml et au rapport de charges souhaité. Après séchage de la solution lipidique (2 mM), le film lipidique est repris dans une solution d'HEPES, pH 7.5, 20mM renfermant 20 mM n-octyl β -D-glucopyranoside à un rapport de poids détergent / lipide de 5/1. La solution an ADN plasmidique est préparée à partir d'une solution mère à 1mg/ml. La suspension lipidique est ajoutée à l'ADN par un pipetage rapide et répété afin d'obtenir une concentration en acide nucléique de 0.1 mg/ml et un rapport de charge 10. Le détergent est éliminé par une étape de dialyse contre 20 Mm hepes, pH 7.5 pendant 3 à 4 heures (limite d'exclusion : 13kD ; Sartorius).

3. Transfection in vitro avec les complexes ADN/lipides cationiques

Les cellules A549 (cellules humaines épithéliale de cancer pulmonaire) sont cultivées selon les conditions standard dans des plaques de microtitration pendant 24 heures. Les complexes sont préparés selon l'une des techniques décrites ci-dessus. Une série de dilutions en cascade des complexes (2 à 0.01 µg de plasmide complexé) est réalisée. Ces dilutions sont ajoutées (225 µl) aux cellules cultivées. 4 heures après le début de l'incubation, 25 µl de sérum de veau fœtal sont éventuellement ajoutés.

La transfection est arrêtée après 48 heures. Le milieu de culture est enlevé avec 100 µl de PBS, puis lysées avec 50 µl de tampon de lyse (Promega). Jusqu'au moment de la mesure de l'activité luciférase, les cellules lysées sont conservées à -80°C. L'activité luciférase est mesurée sur une alicote de 20 µl à l'aide d'un luminomètre Berthold LB96P. Une gamme standards étalon est réalisée en parallèle afin de corréliser l'activité mesurée en RLU avec la quantité exprimée en fg de luciférase exprimée. La mesure en protéine est effectuée selon la procédure standard BCA telle que proposée par le fournisseur (Pierce).

4. Résultats

Les Figures 1 à 14 montrent les résultats observés après transfection in vitro avec des complexes renfermant les lipides (pcTG 51 à pcTG54, pcTG57 à pcTG60). Les quantités d'ADN varient de 0.5 à 0.01 µg par puits, en présence ou en l'absence de DOPE, pour des rapports de charges variant de 0.8 à 10 (voir figures).

pcTG51 est un lipide cyclique diaminé, dont la partie hydrophobe est 2xC₁₄, et aucune double liaison, renfermant 2 charges positives :

pcTG52 est un lipide cyclique diaminé, dont la partie hydrophobe est 2xC₁₄, et aucune double liaison, renfermant 2 charges positives

pcTG53 est un lipide cyclique diaminé, dont la partie hydrophobe est $2 \times C_{14}$ et aucune double liaison, renfermant 2 charges positives ; ce composé renferme un groupe hydroxyle (voir description) qui le rend plus hydrophile ;

5 pcTG54 est un lipide cyclique diaminé, dont la partie hydrophobe est $2 \times C_{10}$ et aucune double liaison, renfermant 2 charges positives ;

pour la synthèse de pcTG 51 à pcTG54 voir les exemples précédents ;

10 pcTG57 est un lipide cyclique diaminé, dont la partie hydrophobe est $4 \times C_8$ et aucune double liaison, renfermant 2 charges positives ;

pcTG58 est un lipide cyclique diaminé, dont la partie hydrophobe est $4 \times C_8$ et aucune double liaison, renfermant 2
15 charges positives ;

pcTG57 et pcTG58 sont l'isomère l'un de l'autre (voir description)

pcTG59 est un lipide cyclique diaminé, dont la partie hydrophobe est $4 \times C_8$ et aucune double liaison, renfermant 2
20 charges positives ;

pcTG60 est un lipide cyclique diaminé, dont la partie hydrophobe est $4 \times C_8$ et aucune double liaison, renfermant 2 charges positives ;

25 pcTG59 et pcTG60 sont l'isomère l'un de l'autre (voir description).

Les résultats observés avec les lipides préparés selon la technique décrite en 1 ou en 2 sont identiques.

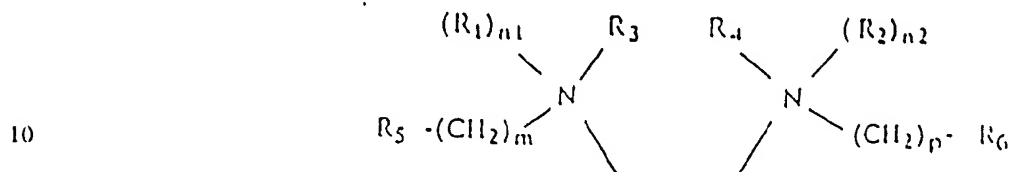
Les conclusions des résultats proposés sur les figures 1 à 14 sont :

30 - les complexes renfermant le pcTG51 (figures 1 et 2) : la présence de DOPE permet d'améliorer considérablement l'efficacité de la transfection, notamment en présence de sérum. Un rapport de charge inférieur à 1.25 n'est pas favorable à la transfection.

- les complexes renfermant le pcTG52 (figures 3 et 4) : le même constat peut être effectué concernant la présence de DOPE. Néanmoins, en présence de DOPE, et pour un rapport de charge 0.8, on observe ici une efficacité de transfection convenable.
- 5 - les complexes renfermant le pcTG53 (figures 5 et 6) : pour ce lipide, il semble que le choix du rapport de charge ait une importance plus déterminante quant à l'efficacité de la transfection obtenue. L'addition de DOPE permet de corriger l'effet inhibant du sérum.
- 10 - les complexes renfermant le pcTG54 (figures 7 et 8) : l'addition de DOPE dans la formulation des complexes correspondants ne semble pas jouer un rôle déterminant par rapport aux résultats observés.
- 15 - les complexes renfermant le pcTG57 (figure 9) : la présence de DOPE permet d'améliorer l'efficacité de la transfection ; le sérum n'a pas d'influence sur cette efficacité.
- 20 - les complexes renfermant le pcTG58 (figure 10) : la DOPE permet de corriger l'effet inhibant du sérum sur la transfection.
- 25 - les complexes renfermant le pcTG59 (figures 11 et 12) ou les complexes renfermant le pcTG60 (figures 13 et 14) : la présence de DOPE permet d'améliorer considérablement l'efficacité de transfection des complexes renfermant un tel liide, en présence ou en l'absence de sérum.

REVENDICATIONS

1. Complexe comprenant au moins un lipide et au moins une substance thérapeutiquement active, utilisable pour le transfert de ladite substance à l'intérieur d'une cellule cible, caractérisé en ce que ledit lipide est de formule I :



dans laquelle :

15 n_1, n_2 identiques ou différents sont des nombres entiers choisis parmi 0 ou 1,

R_1, R_2 identiques ou différents, sont :

20 a) choisis parmi le groupe constitué par un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués, indépendamment les uns des autres, par un radical hydroxyle, ou

b) selon un cas particulier pour lequel $n_1 = n_2 = 1$, R_1 et R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

25 R_3, R_4 , identiques ou différents sont des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

m, p identiques ou différents sont des nombres entiers compris entre 1 et 10,

30 R_5, R_6 , identiques ou différents sont choisis dans le groupe constitué par les radicaux de formule :

1) R_7 C(=O)-X- dans laquelle :

X = NH, O, S,

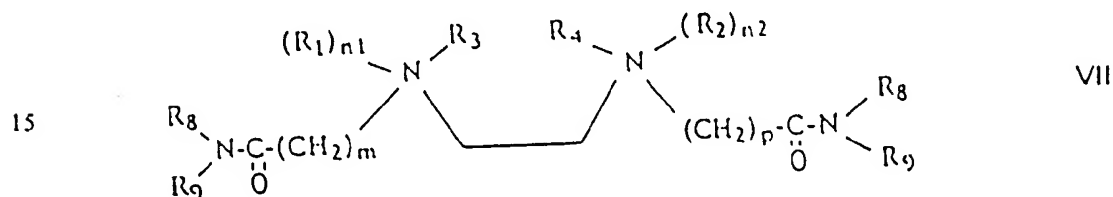
R_7 est un radical de 6 à 23 atomes de carbone (C₆-C₂₃) alkyle ou alcényle, linéaire ou ramifié,

2) $R_8R_9NC(=O)-$ dans laquelle :

R_8 , R_9 , identiques ou différents sont choisis parmi le groupe constitué par l'atome d'hydrogène ou des radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaires ou ramifiés, à la condition que R_8 , R_9 ne puissent correspondre simultanément à l'atome d'hydrogène,

3) et l'un des radicaux R_8 , R_9 pouvant en outre correspondre à l'atome d'hydrogène ,

2. Complexe selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit lipide est un lipide de formule VII :



dans laquelle :

n_1 , n_2 identiques ou différents sont des nombres entiers choisis parmi 0 ou 1,

R_1 , R_2 identiques ou différents, sont

a) choisis parmi le groupe constitué par un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués, indépendamment les uns des autres, par un radical hydroxyle, ou

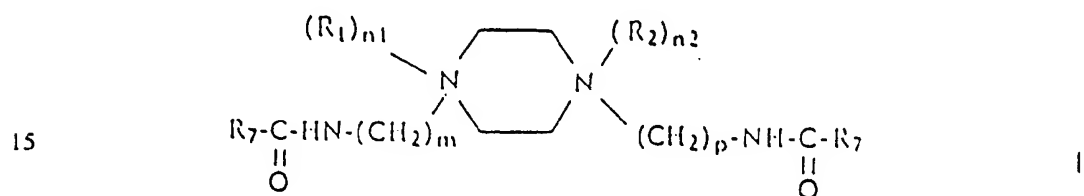
b) selon un cas particulier pour lequel $n_1 = n_2 = 1$, R_1 et R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

R_3 , R_4 , identiques ou différents sont des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

m , p identiques ou différents sont des nombres entiers compris entre 1 et 10,

R_8 , R_9 , identiques ou différents sont choisis parmi le groupe consistant en l'atome d'hydrogène ou des radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaires ou ramifiés, à la condition que R_8 , R_9 ne puissent correspondre simultanément à l'atome d'hydrogène, et
 5 les radicaux NR_8R_9 de chaque côté de la molécule peuvent être différents.

3. Complexe selon la revendication 1 caractérisé en ce que
 10 ledit lipide est un lipide de formule II:



20 dans laquelle :

n_1 , n_2 identiques ou différents sont choisis parmi les nombres entiers 0 ou 1,

R_1 , R_2 , identiques ou différents sont choisis parmi le groupe consistant en un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à
 25 6 atomes de carbone, éventuellement substitués, indépendamment les uns des autres, par des radicaux hydroxyles, avec, dans le cas particulier où $n_1 = n_2 = 1$, R_1 , R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone,

m , p identiques ou différents sont des nombres entiers compris
 30 entre 1 et 10,

R_7 identique ou différent est un radical de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaire ou ramifié.

62

4. Complexe selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que

. R_1 et/ou R_2 ou,

. R_3 et/ou R_4

5 est le radical méthyle.

5. Complexe selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que

. R_1 et R_2 et/ou

10 . R_3 et R_4

forment ensemble une chaîne éthylène.

6. Complexe selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que

15 . R_1 et R_2 et/ou

. R_3 et R_4

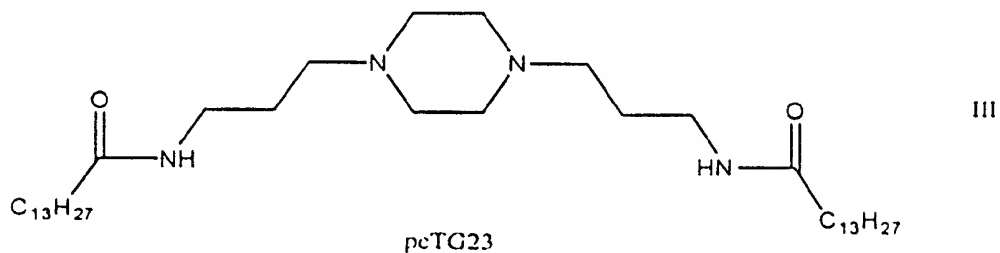
forment ensemble une chaîne propylène.

7. Complexe selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que m et/ou p sont des nombres entiers compris entre 1 et 6.

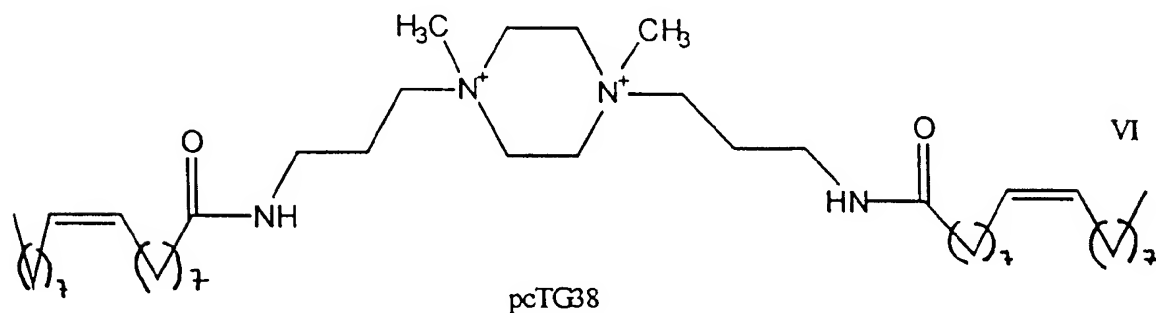
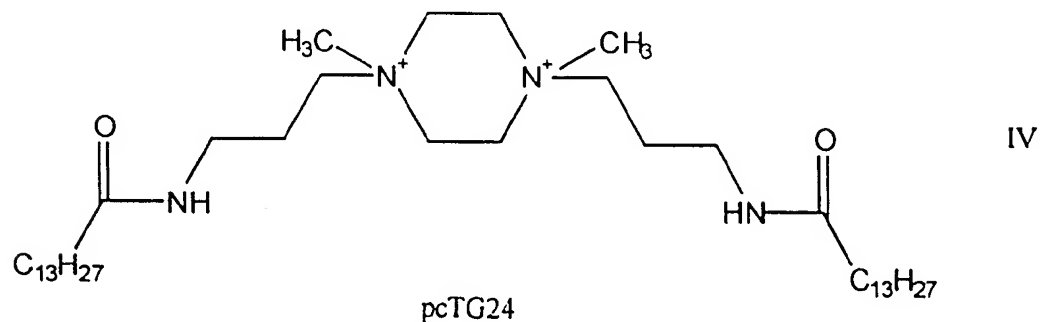
8. Complexe selon les revendications 1 ou 3 caractérisé en ce que les radicaux R , $C(=O)$, identiques ou différents sont des radicaux de 13 à 18 atomes de carbone, notamment les radicaux oléoyle, stéaroyle, palmitoyle, myristoyle.

30

9. Complexe selon les revendications 1, 3 ou 8 caractérisé en ce que ledit lipide est choisi dans le groupe constitué par les composés de formule suivante :



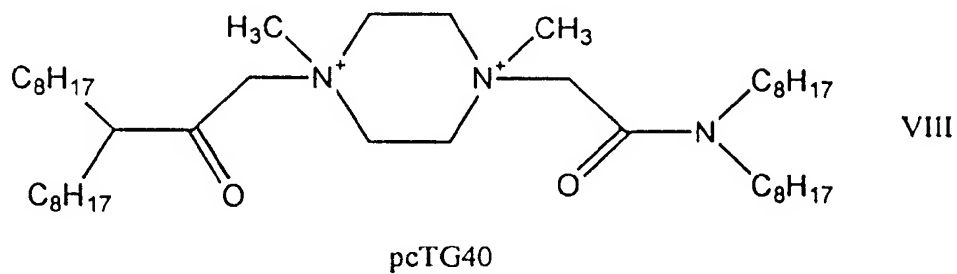
5



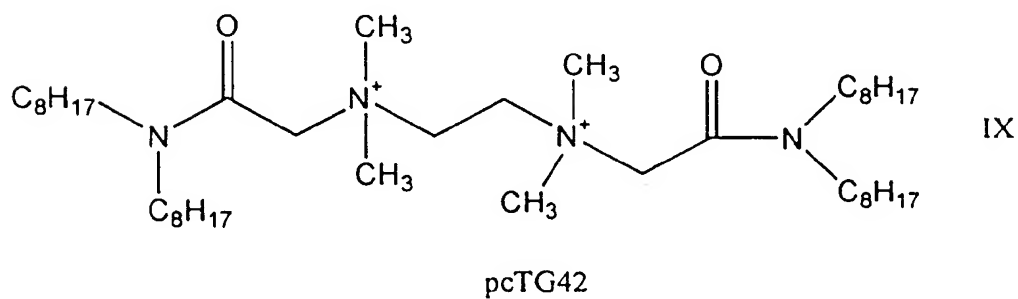
10

10. Complexe selon les revendications 1 ou 3 caractérisé en ce que R_8 , R_9 sont choisis parmi les radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle.

11. Complexe selon les revendications 1,3 ou 10 caractérisé en ce que lesdits lipides sont choisis dans le groupe constitué par les composés de formules suivantes :



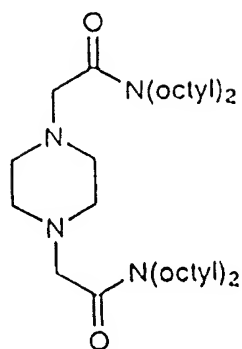
5



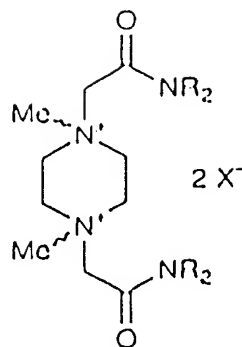
10

15

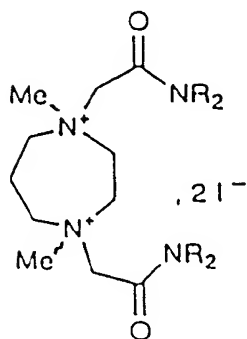
20



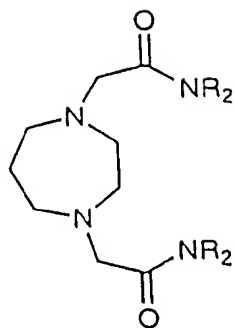
Diamide ANI 181



ANII 16 F1, ANII 16 F2 : R = $-(CH_2)_7Me$, X = I^-
 ANII 150 F1, ANII 150 F2 : R = $-(CH_2)_{13}Me$, X = Br^-
 ANII 157 F1, ANII 157 F2 : R = oléyle, X = Br^-

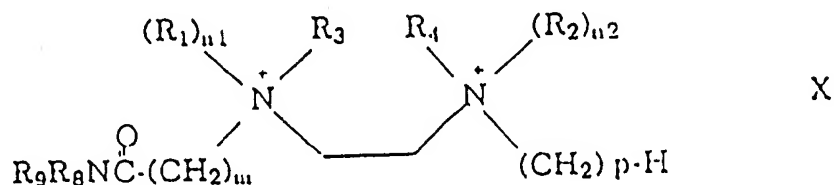


ANII 22 F1, ANII 22 F2 : R = $-(CH_2)_7Me$
 ANII 152 F1, ANII 152 F2 : R = $-(CH_2)_{13}Me$.



Diamide ANII 21 : R = $-(CH_2)_7Me$
 Diamide ANII 151 : R = $-(CH_2)_{13}Me$

12. Complexe selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit lipide est de formule X :



dans laquelle :

n_1, n_2 identiques ou différents sont des entiers choisis parmi 0 ou 1,

15 R_1, R_2 , identiques ou différents, sont

a) choisis parmi le groupe constitué par un atome d'hydrogène et des radicaux alkyle de 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués par un radical hydroxyle, ou

b) selon un cas particulier pour lequel $n_1 = n_2 = 1$, R_1 et R_2 peuvent former ensemble une chaîne divalente alkylène de 2 à 3 atomes de carbone (C2-C3),

m, p identiques ou différents sont des nombres entiers compris entre 1 et 10,

25 R_8, R_9 , identiques ou différents sont choisis parmi le groupe constitué par l'atome d'hydrogène et des radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle, linéaires ou ramifiés, à la condition que R_8, R_9 ne puissent correspondre simultanément à l'atome d'hydrogène.

30 13. Complexe selon la revendication 12 caractérisé en ce que :

. R_1, R_2 ou

. R_3, R_4

sont le radical méthyle ou hydroxyéthyle.

14. Complexe selon la revendication 12 caractérisé en ce que :

. R_1 et R_2 ou

. R_1 et R_4

5 forment ensemble une chaîne éthylène.

15. Complexe selon la revendication 12 caractérisé en ce que :

. R_1 et R_2 ou

10 . R_3 et R_4

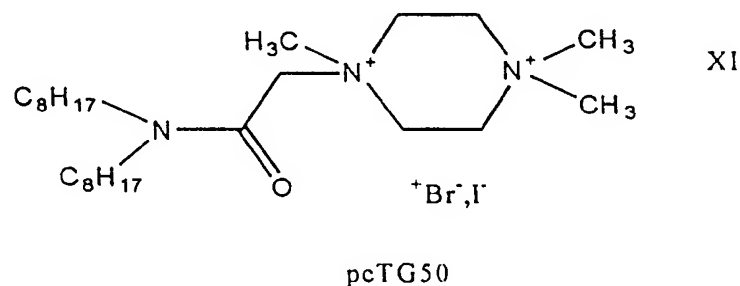
forment ensemble une chaîne propylène.

16. Complexe selon l'une des revendications 12 à 15 caractérisé en ce que m est un nombre entier compris entre 1 et 15 6 et p=1.

17. Complexe selon l'une des revendications 12 à 16 caractérisé en ce que R_3 , R_4 sont choisis parmi les radicaux de 6 à 23 atomes de carbone alkyle ou alcényle.

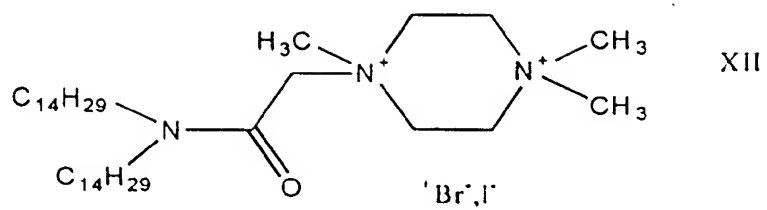
20

18. Complexe selon l'une des revendications 12 à 17 caractérisé en ce que lesdits lipides sont choisis dans le groupe constitué par les composés de formules suivantes :

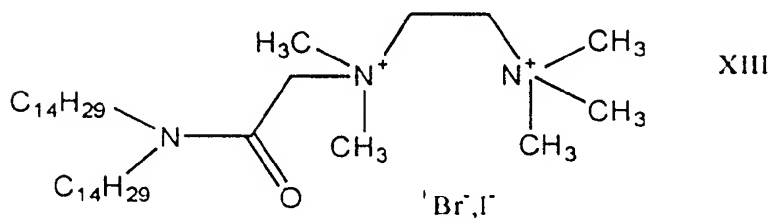


25

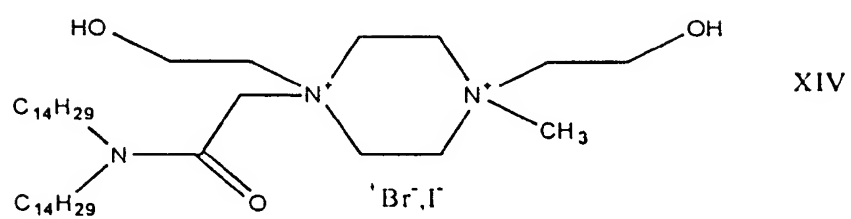
68



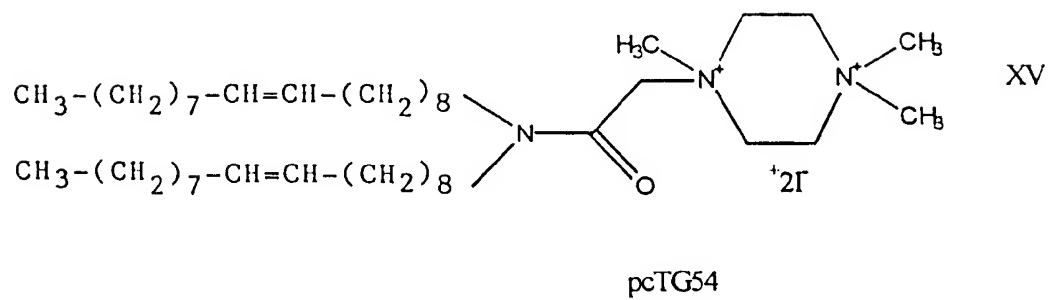
pcTG51

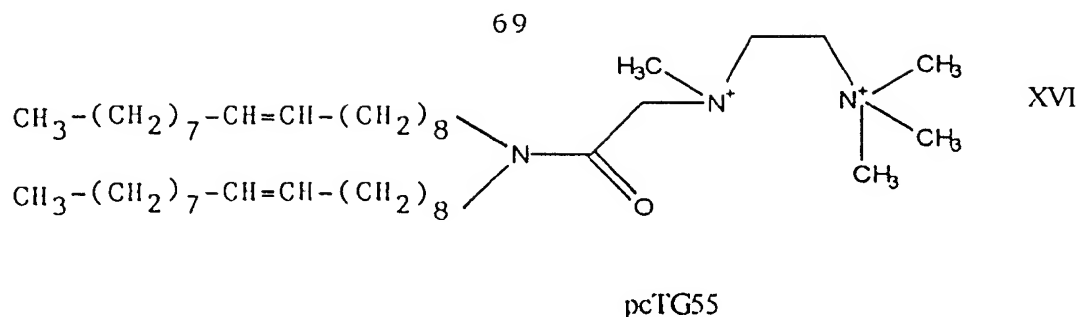


pcTG52



pcTG53





19. Complexe selon l'une des revendications 1 à 18
caractérisé en ce que ledit lipide est l'un, l'autre ou un
5 mélange des deux diastéréoisomères (cis et/ou trans)
correspondant audit lipide .

20. Complexe selon l'une des revendications 1 à 19
caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un adjuvant
10 susceptible d'améliorer la formation des complexes entre undit
lipide et une dite substance thérapeutiquement active, ou
d'améliorer le fonctionnement de ces complexes vis-à-vis de la
cellule.

15 21. Complexe selon la revendication 20 caractérisé en ce
que ledit adjuvant est un lipide neutre ou zwitterionique, tel
que par exemple un triglycéride, un diglycéride, le
cholestérol , qui dérive d'une phosphatidyl éthanolamine (PE),
phosphatidylcholine, phosphocholine, sphingomyéline, céramide ou
20 cérébroside, de façon préférée la dioleoylphosphatidyl
éthanolamine (DOPE) ou la phosphatidyl éthanolamine (PE).

22. Complexe selon la revendication 21 caractérisé en ce
que le rapport en poids entre le lipide et ledit adjuvant est
25 compris entre 0,1 et 10.

23. Complexe selon les revendications 1 à 22 caractérisé en ce que ladite substance thérapeutiquement active est choisie parmi les acides nucléiques et les protéines, de préférence, la substance active du complexe est un polynucléotide.

5

24. Complexe selon les revendications 1 à 23 caractérisé en ce que le rapport entre le nombre de charges positives du lipide cationique et le nombre de charges négatives de la substance thérapeutiquement active soit compris entre 0,05 et 10
20, notamment entre 0,1 et 15 et de préférence entre 5 et 10.

25. Complexe selon la revendication 1 caractérisé en ce que le lipide est choisi parmi le groupe consistant en :

- lipide selon la revendication 1 pour lequel $R_1=R_2$ =méthyle ;
15 R_3, R_4 forment ensemble une chaîne éthylène, $m=3$, $p=3$,
 $R_5=R_6$ =NHC(=O) $C_{10}H_{17}$ (pcTG24) ;
- lipide selon la revendication 1 pour lequel $R_1=R_2=R_3=R_4$ =méthyle , $R_5=R_6$ = C(=O)-N ($C_{10}H_{17}$)₂ (pcTG42).

20 26. Utilisation d'un complexe selon les revendications 1 à 25 pour la préparation d'un médicament à but curatif, préventif ou vaccinal, destiné au traitement du corps humain ou animal, notamment par thérapie génique.

25 27. Utilisation d'un complexe selon les revendications 1 à 25 pour transférer au moins une substance thérapeutiquement active, plus particulièrement un acide nucléique, dans des cellules cibles in vitro.

30 28. Utilisation selon la revendication 26 caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être administré par voie intramusculaire, intratrachéale, intranasale, intracérébrale, intrapleurale, intratumorale, intracardiaque, intragastrique, intrapéritonéale, épidermique, intraveineuse, intraartérielle.

29. Procédé pour introduire une substance thérapeutiquement active comportant des charges négatives à l'intérieur d'une cellule, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules
5 cultivées sur un milieu approprié avec une suspension de complexe selon l'une des revendications 1 à 25 et en ce qu'après un certain temps d'incubation les cellules sont lavées et récupérées.

10 30. Préparation pharmaceutique comprenant au moins un complexe selon l'une des revendications 1 à 25 et renfermant éventuellement au moins un adjuvant capable de stabiliser ladite préparation pharmaceutique en vue de son stockage par exemple et/ou d'améliorer le pouvoir de transfection dudit complexe.

15

31. Préparation pharmaceutique selon la revendication 30 caractérisée en ce que ledit adjuvant est choisi parmi le groupe consistant en la chloroquine, un composé polaire protique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène
20 glycol, le glycérol, l'éthanol, le 1-méthyl L -2-pyrrolidone ou leurs dérivés, ou un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée,
25 l'acétonitrile ou leurs dérivés.

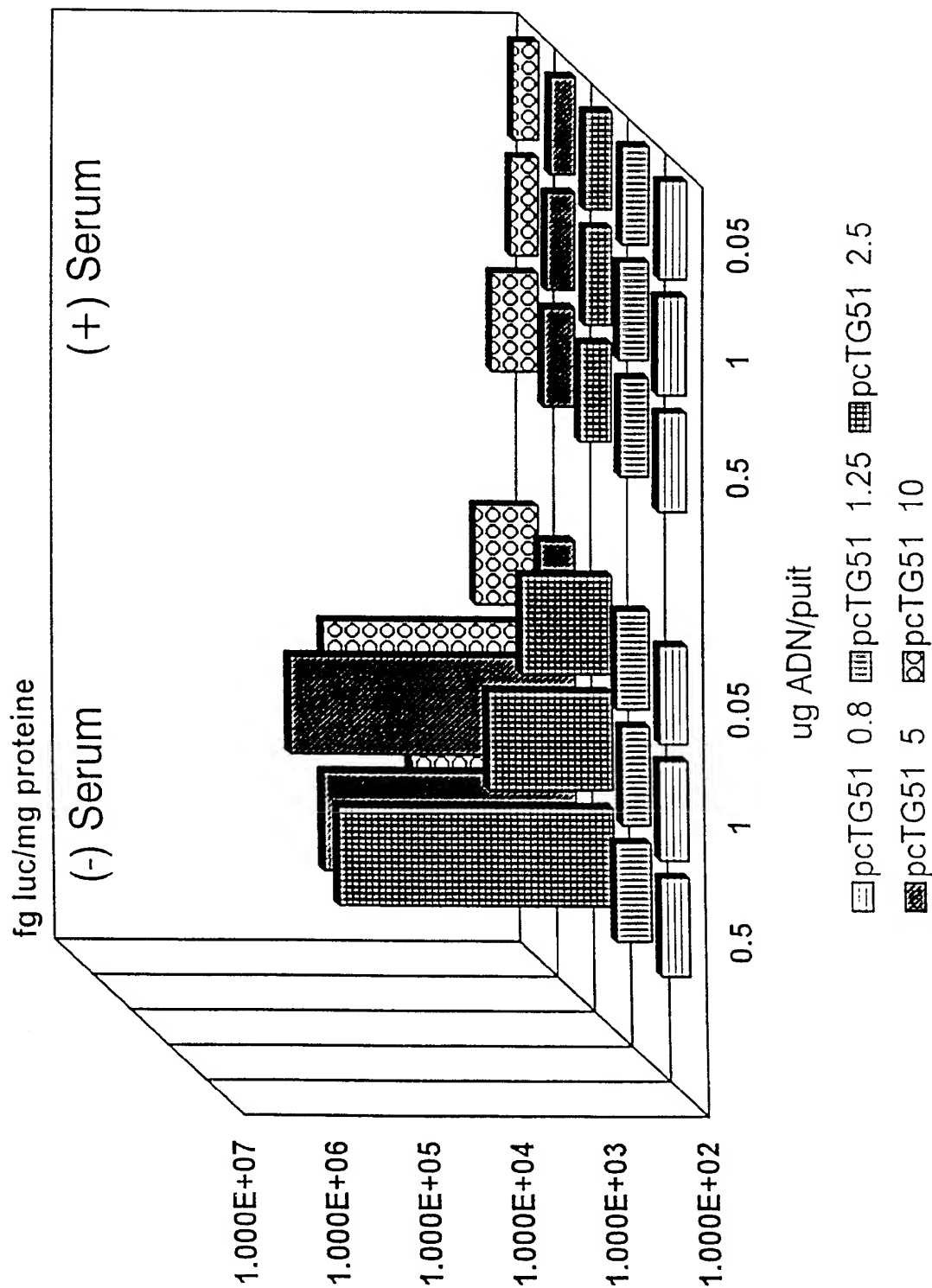


FIGURE 1

2 / 14

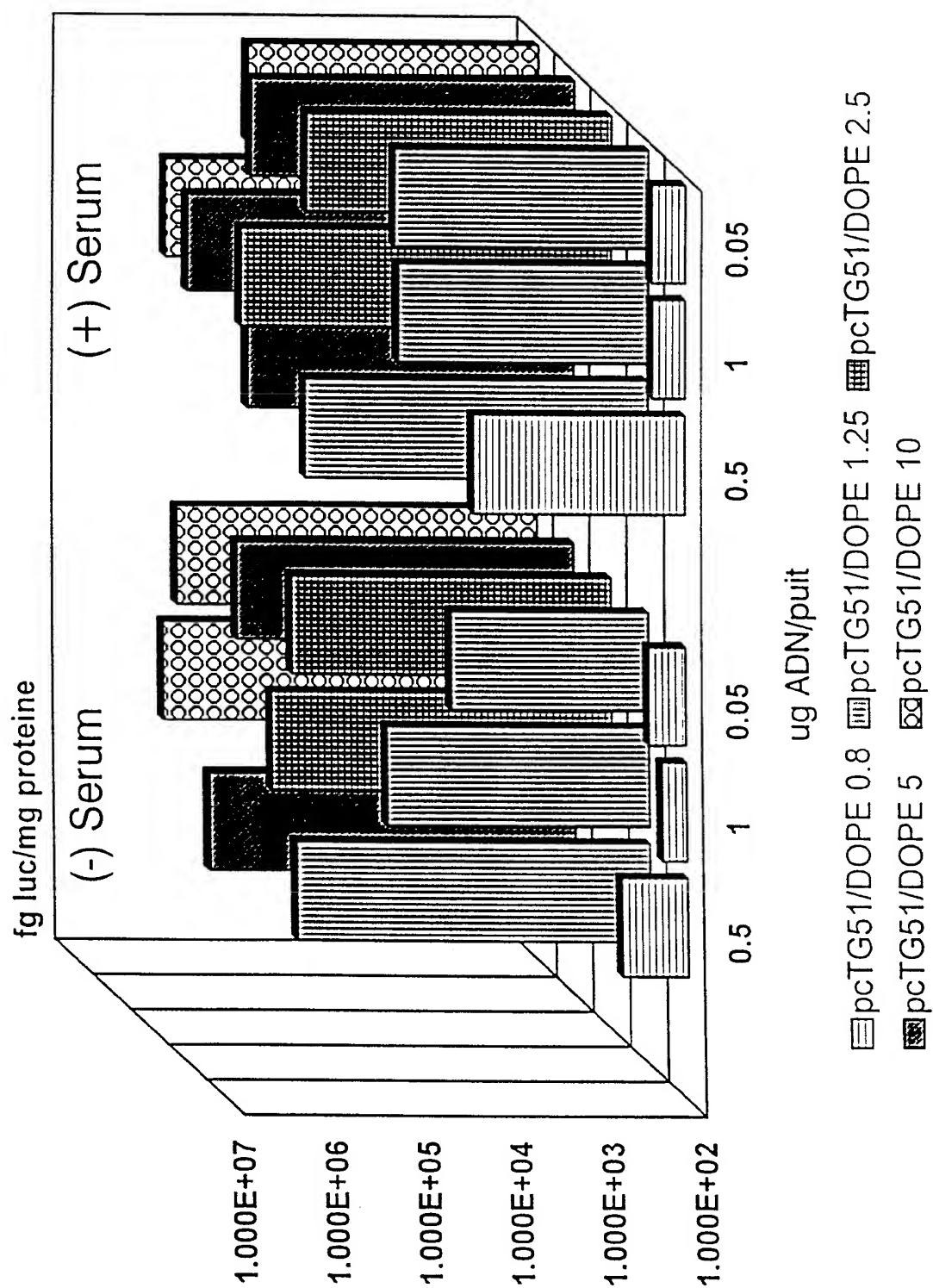


FIGURE 2

3 / 14

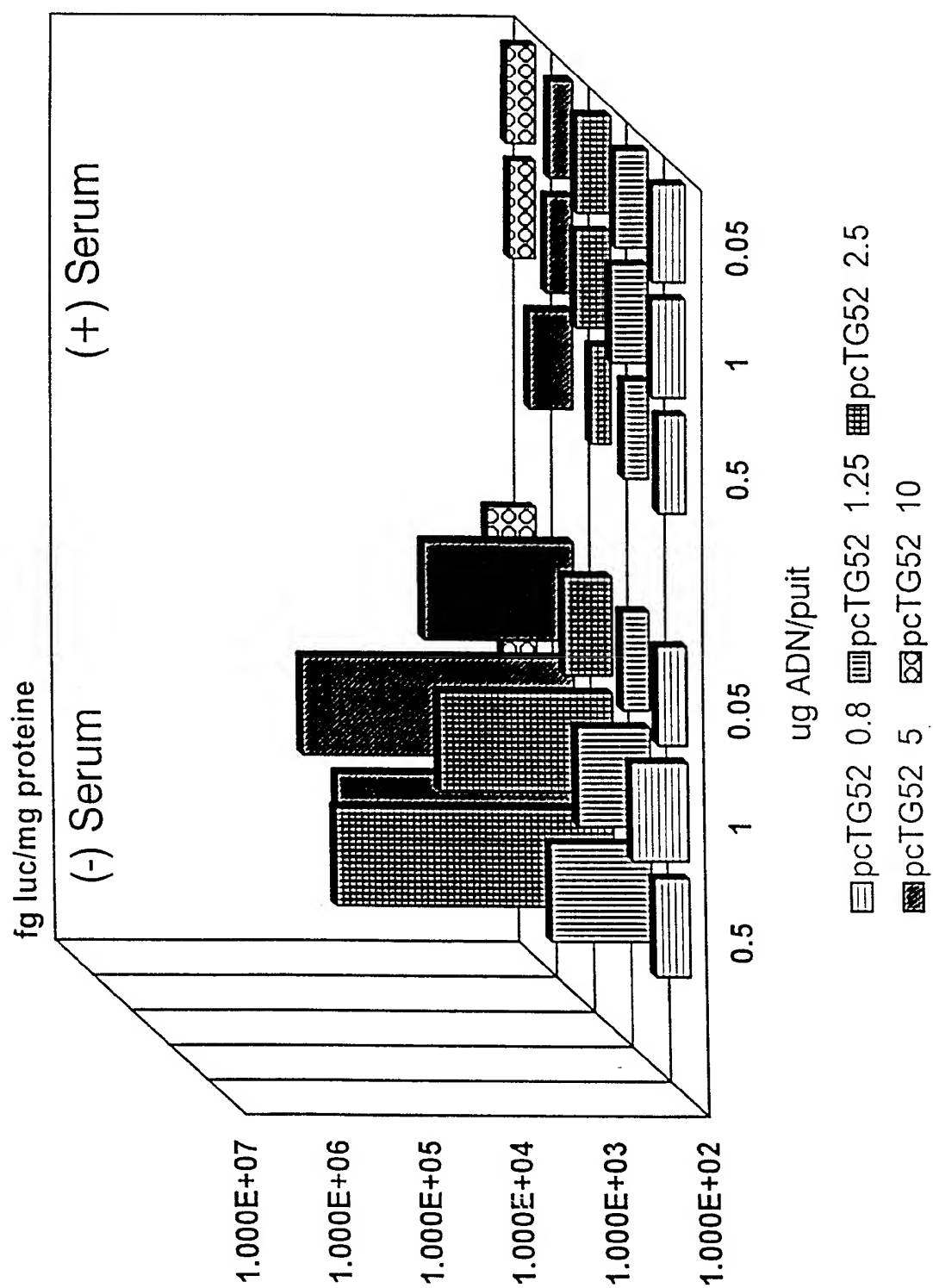


FIGURE 3

4 / 14

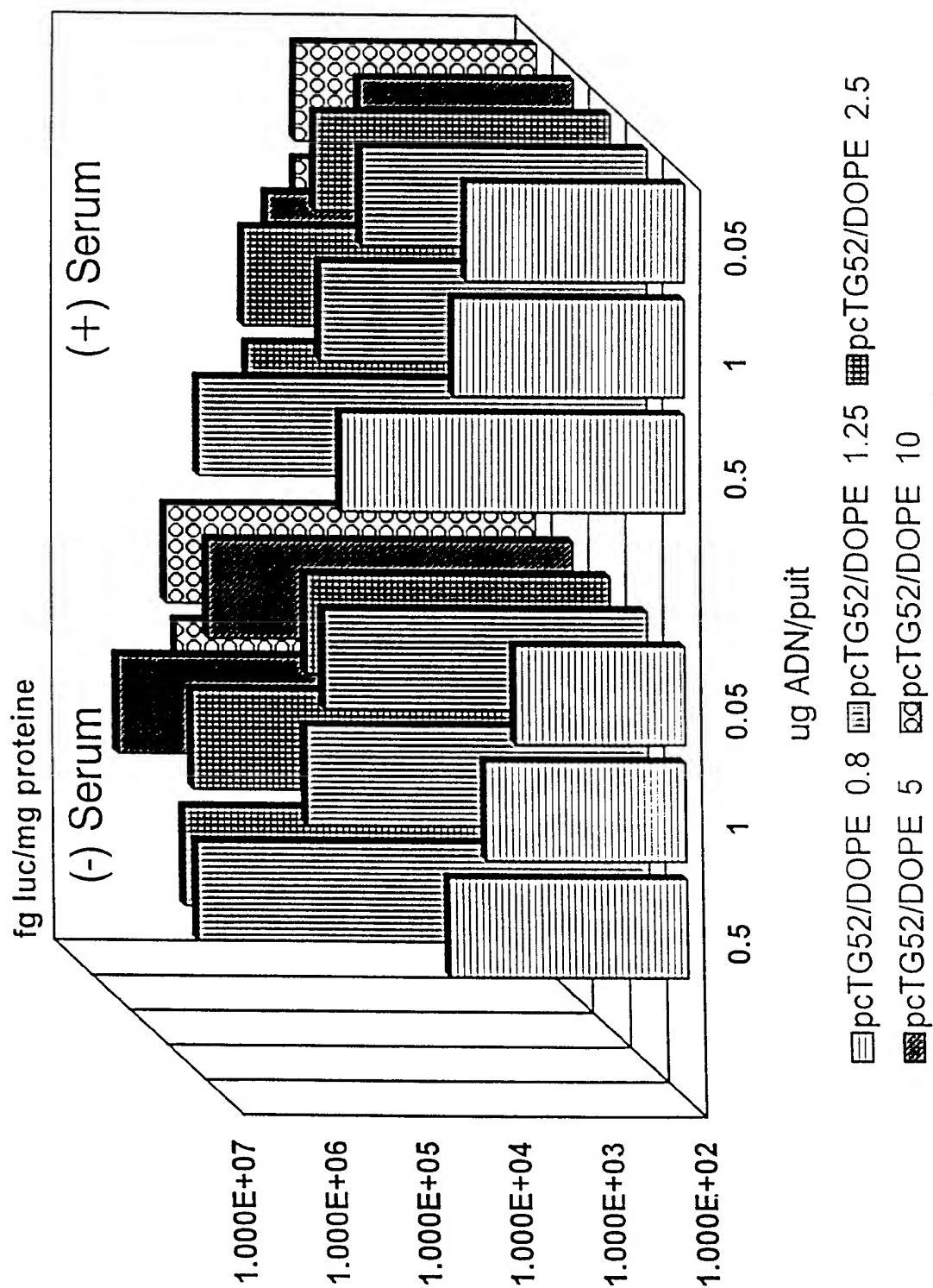


FIGURE 4

5 / 14

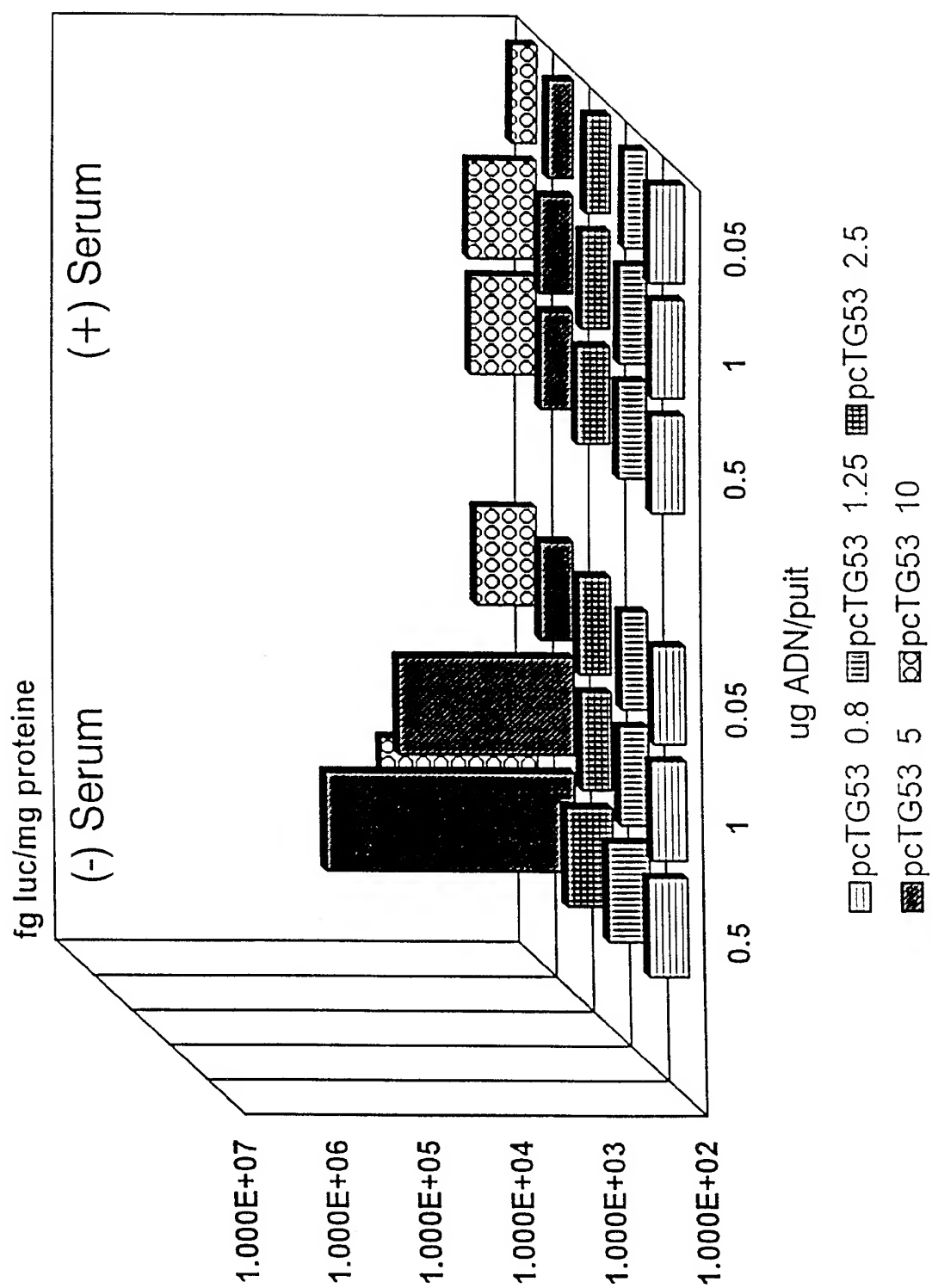


FIGURE 5

6 / 14

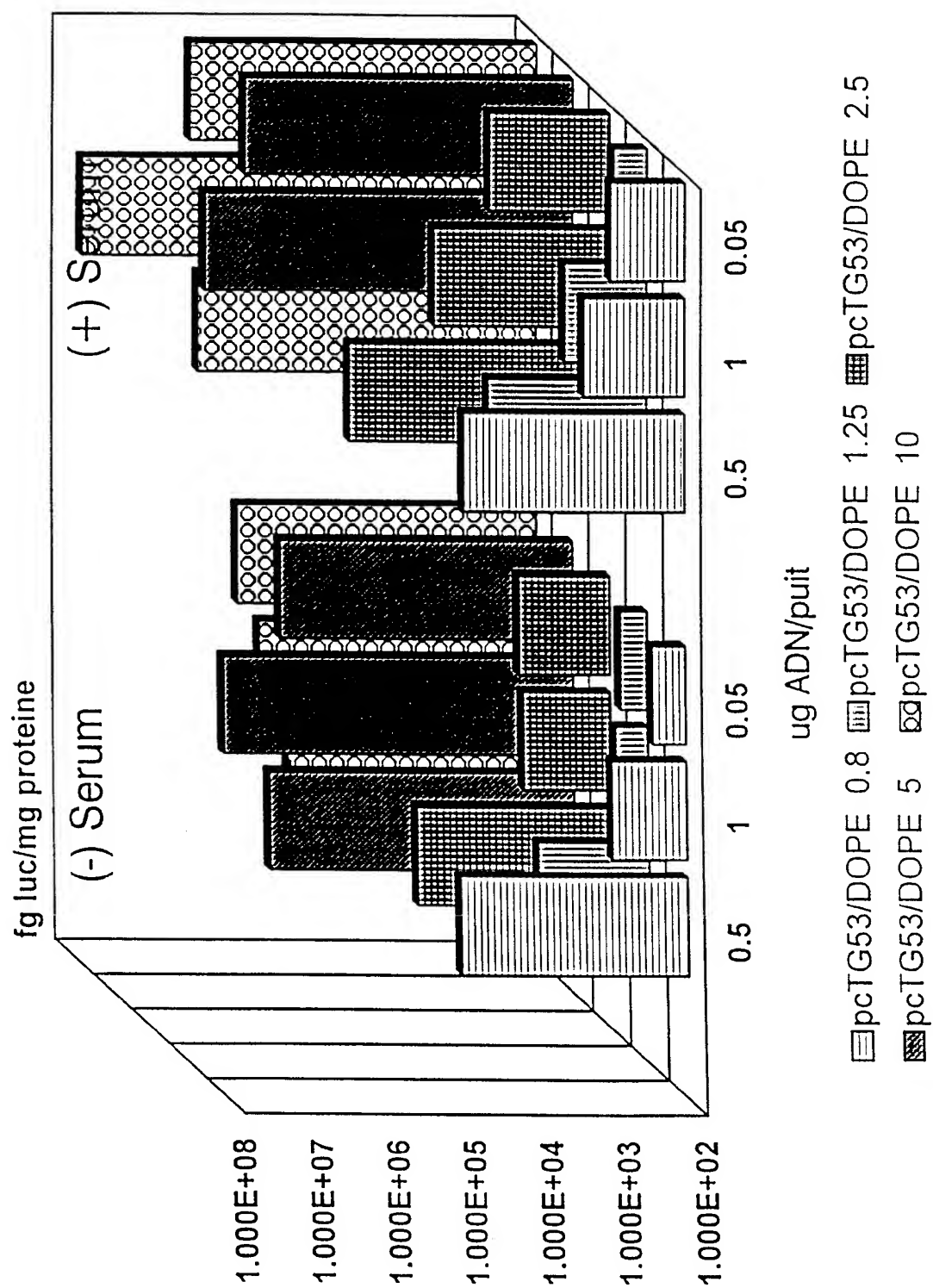


FIGURE 6

7 / 14

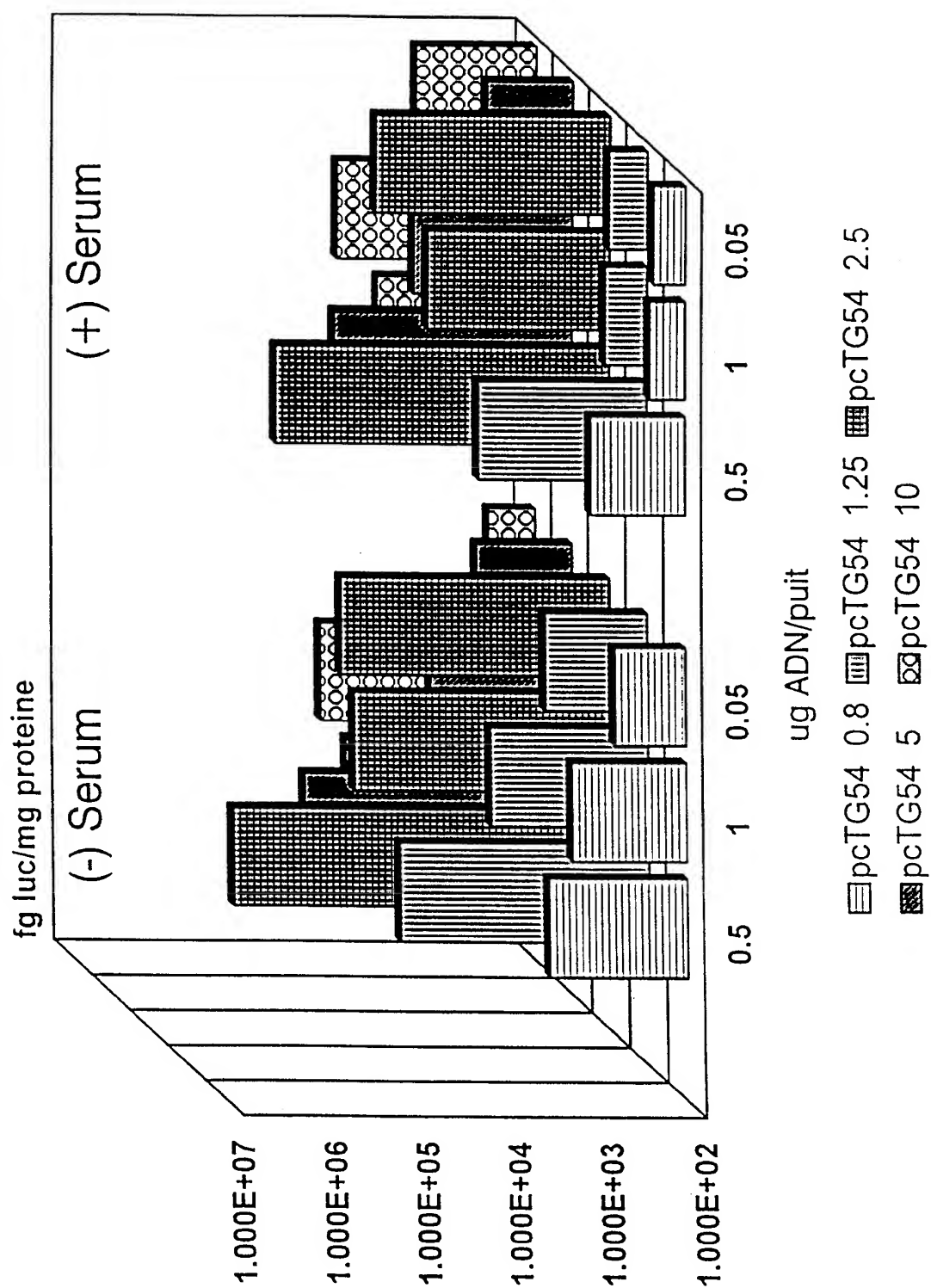


FIGURE 7

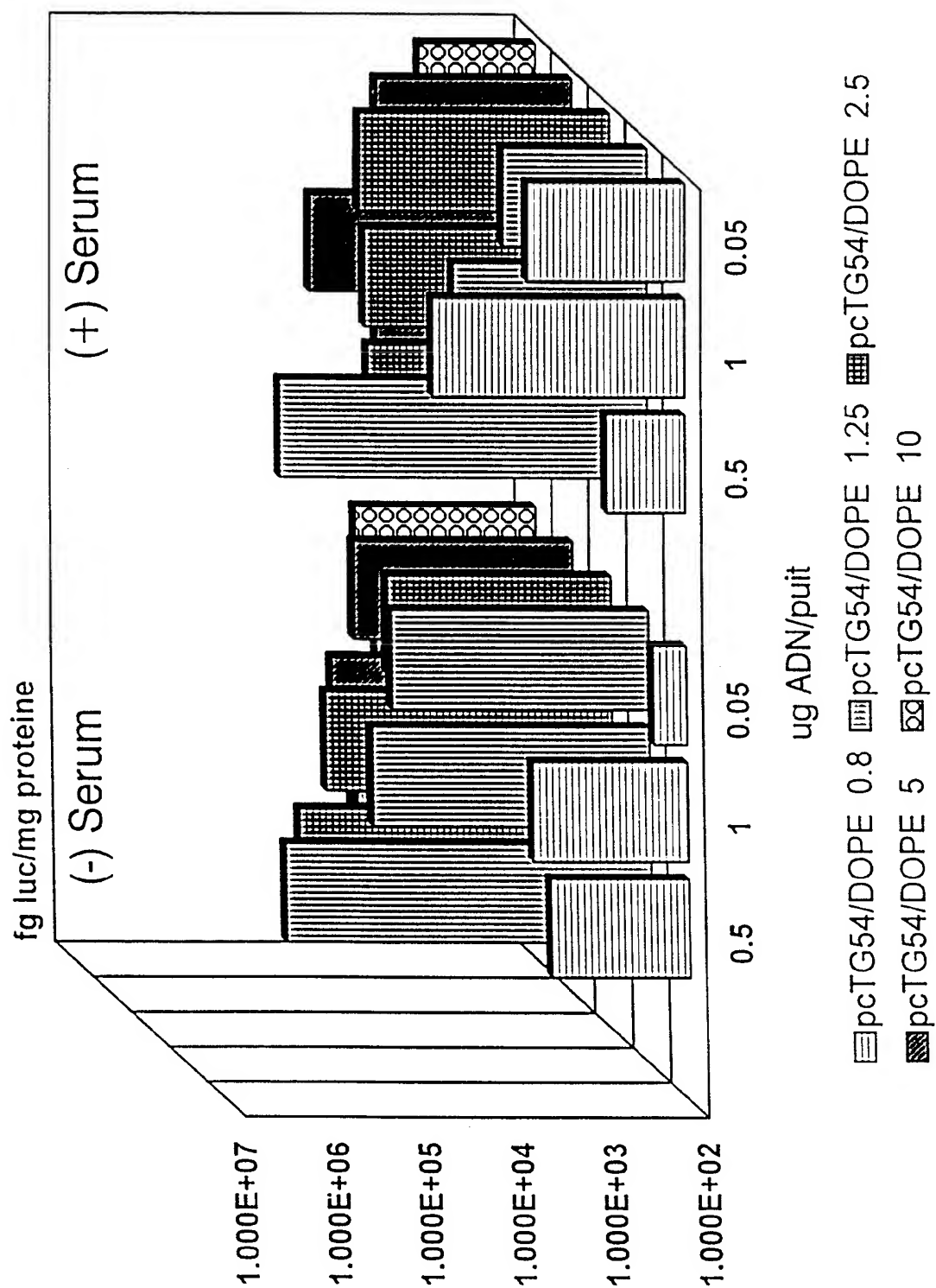


FIGURE 8

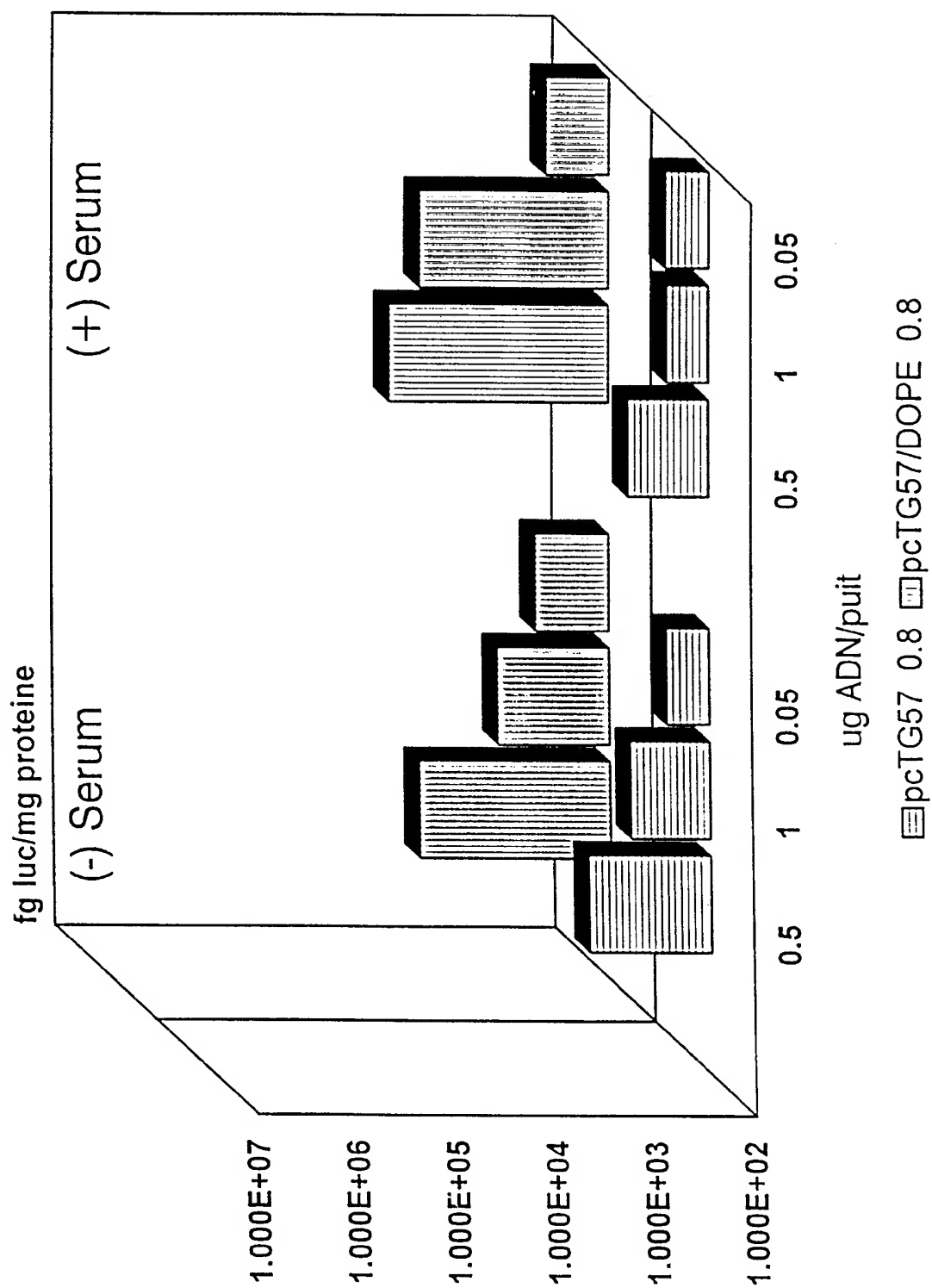


FIGURE 9

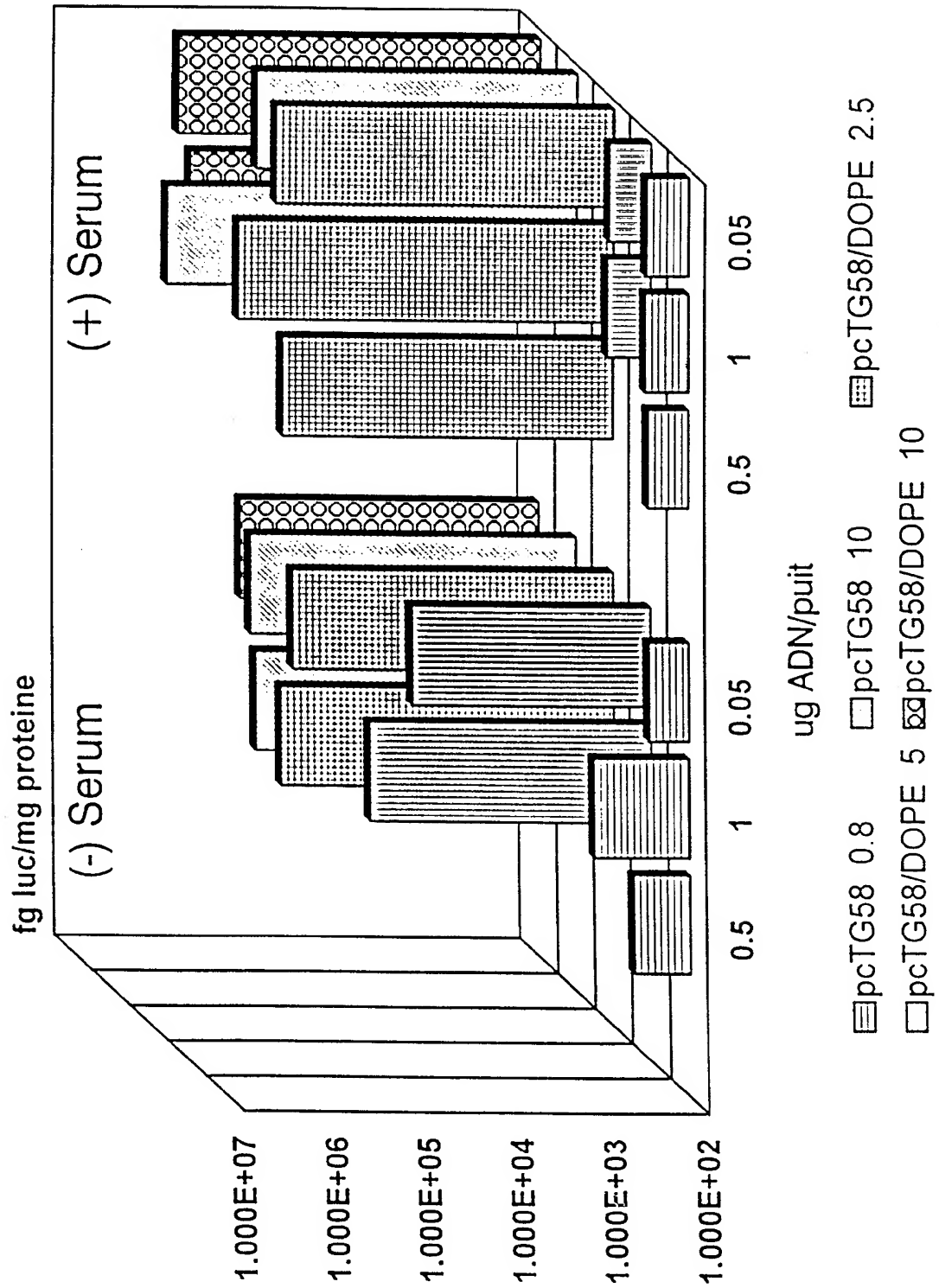


FIGURE 10

11 / 14

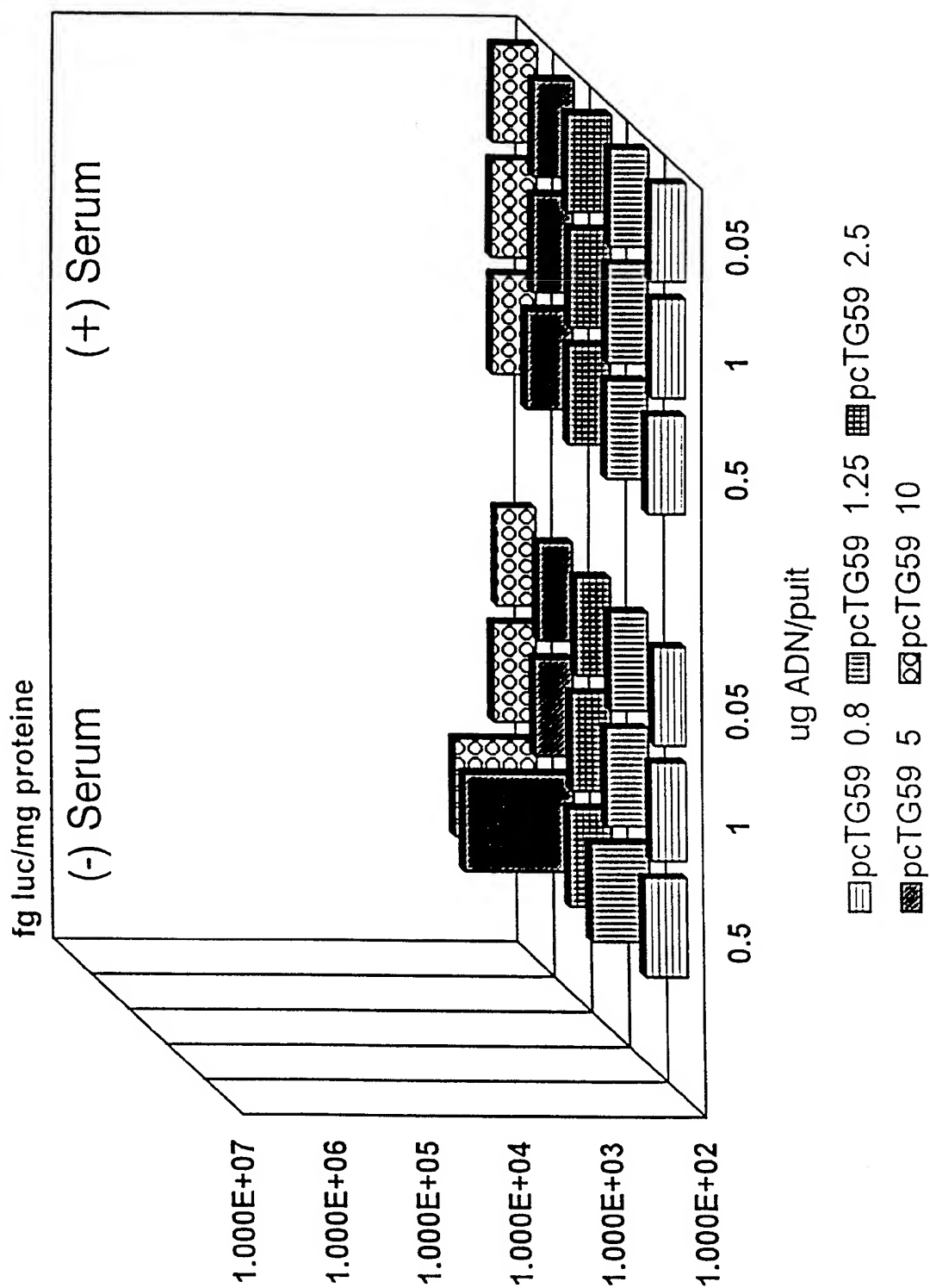


FIGURE 11

12 / 14

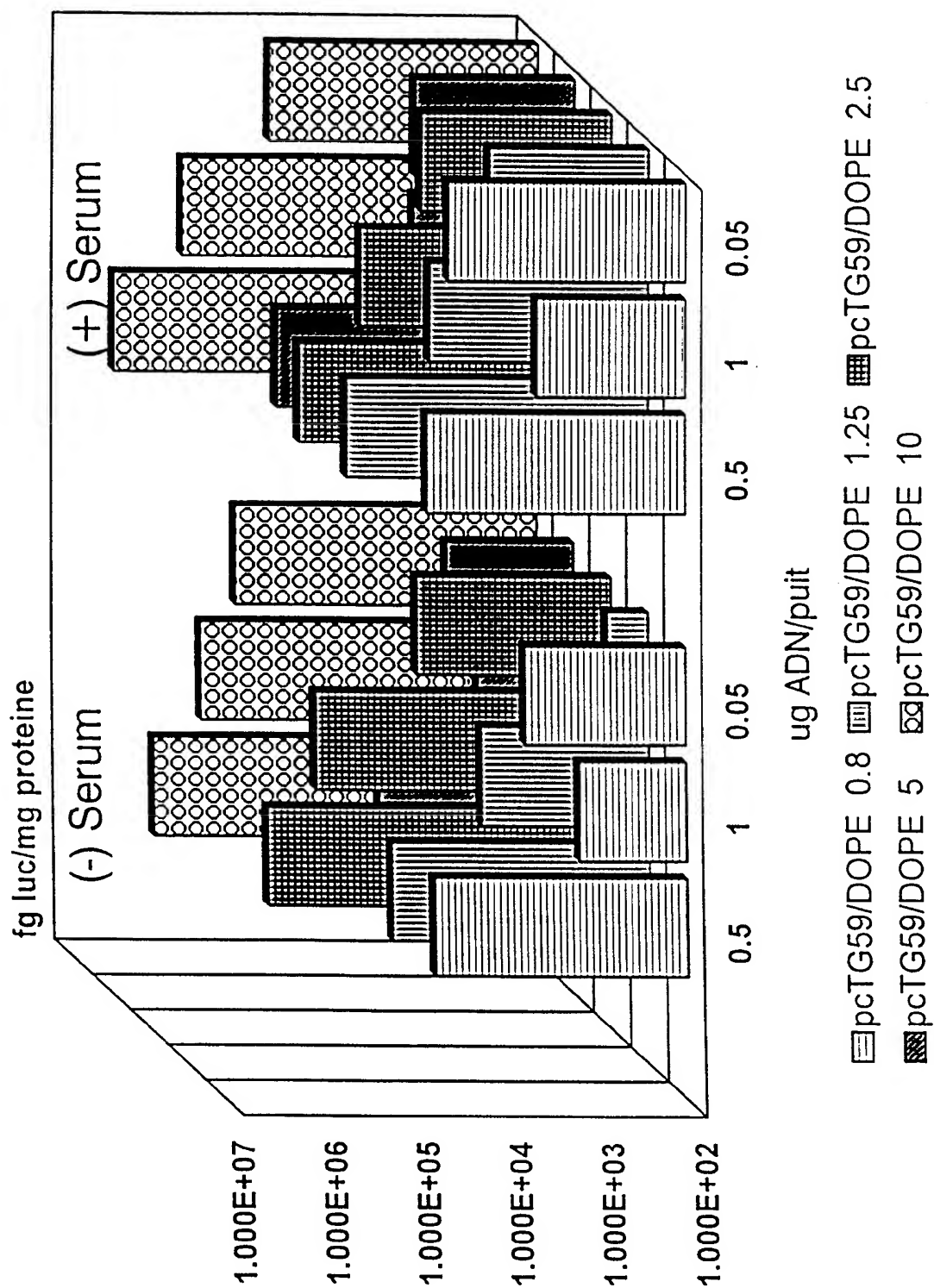


FIGURE 12

13 / 14

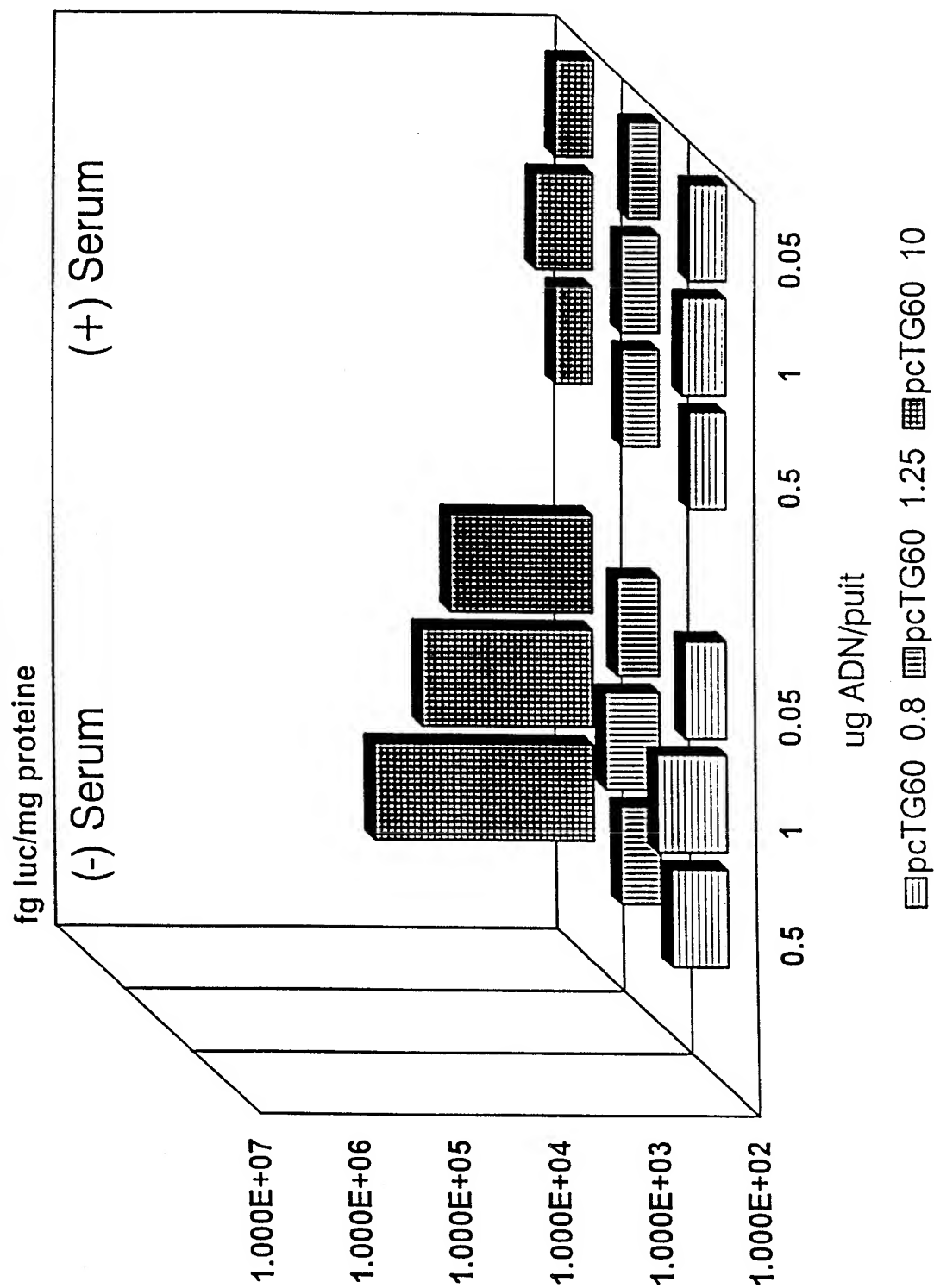


FIGURE 13

14 / 14

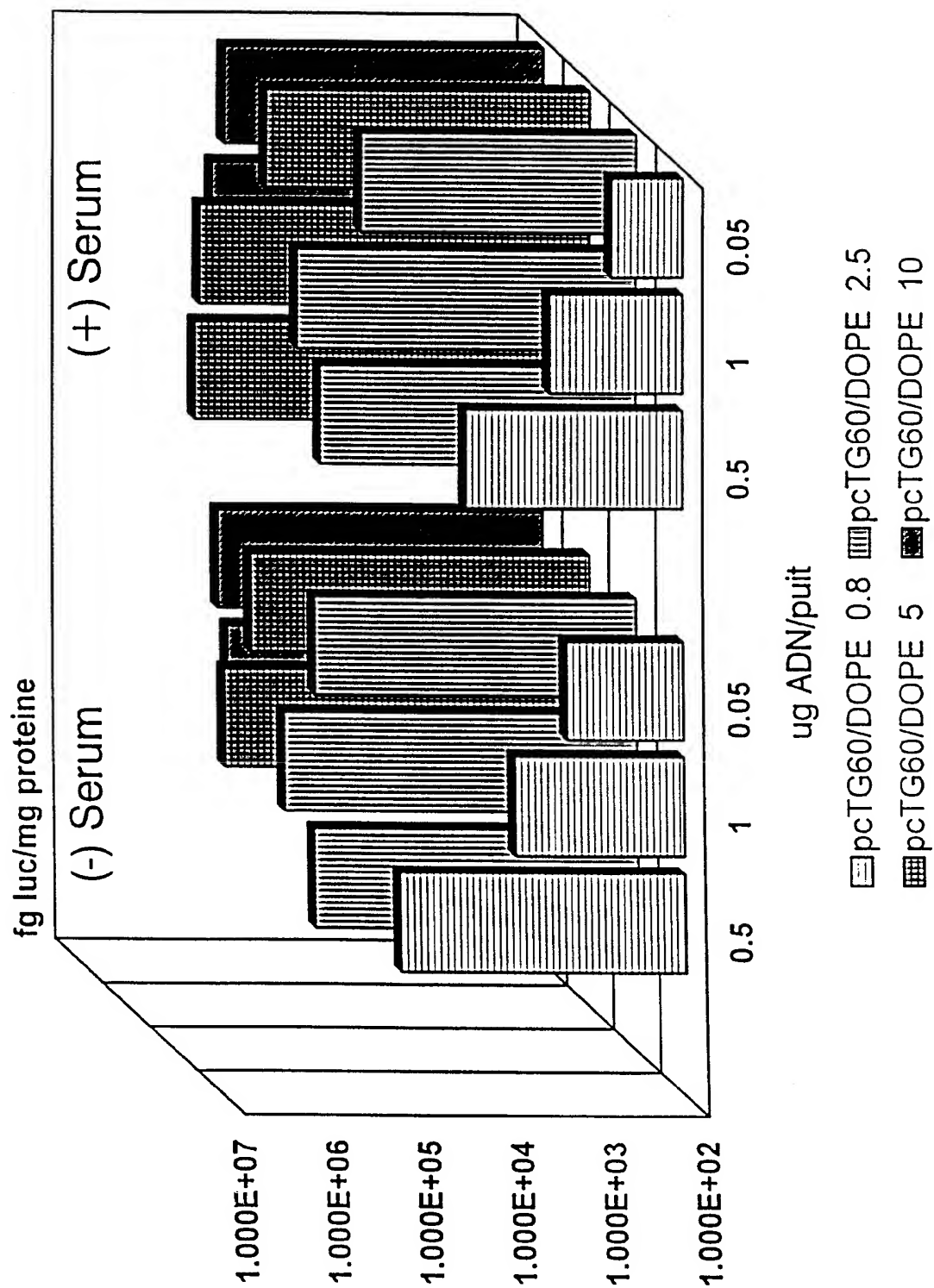


FIGURE 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K47/48 C07C237/06 C07D295/12 C07D295/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07C C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 635 487 A (WOLFF, JON A. ET AL) 3 June 1997 see column 14, line 30 - line 67 ---	1, 3, 5, 7, 8, 19-24, 26-31
X	WO 95 14651 A (MEGABIOS CORP) 1 June 1995 see claims; examples ----	1, 4, 5, 7, 8, 19-24, 26-31
X	SOLODIN, IGOR ET AL: "Synthesis of amphiphilic piperidinium derivatives. Cationic lipids. Part 4" SYNLETT (1996), (7), 619 CODEN: SYNLES; ISSN: 0936-5214, XP002056223 see the whole document ----- -/--	1, 4, 5, 7, 8, 19-24, 26-31



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 1998

Date of mailing of the international search report

16/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pauwels, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01220

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>J.A. RIGGS ET AL.: "Nucleotide carrier mixture with transport selectivity for Ribonucleoside-5'-phosphates"</p> <p>TETRAHEDRON LETTERS,</p> <p>vol. 37, no. 35, 1996, pages 6303-6306,</p> <p>XP002079553</p> <p>OXFORD GB</p> <p>see page 6304; figure 1; table 1</p> <p>-----</p>	<p>1,2,19,</p> <p>20,23-30</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5635487 A	03-06-1997	NONE	
WO 9514651 A	01-06-1995	US 5665879 A	09-09-1997
		AU 677144 B	10-04-1997
		AU 1370795 A	13-06-1995
		CA 2176714 A	01-06-1995
		EP 0730568 A	11-09-1996
		JP 9505593 T	03-06-1997
		US 5776908 A	07-07-1998
		NO 962075 A	10-07-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C. Classification internationale No

PCT/FR 98/01220

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K47/48 C07C237/06 C07D295/12 C07D295/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07C C07D A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 635 487 A (WOLFF, JON A. ET AL) 3 juin 1997 voir colonne 14, ligne 30 - ligne 67 ---	1, 3, 5, 7, 8, 19-24, 26-31
X	WO 95 14651 A (MEGABIOS CORP) 1 juin 1995 voir revendications; exemples ---	1, 4, 5, 7, 8, 19-24, 26-31
X	SOLODIN, IGOR ET AL: "Synthesis of amphiphilic piperidinium derivatives. Cationic lipids. Part 4" SYNLETT (1996), (7), 619 CODEN: SYNLES; ISSN: 0936-5214, XP002056223 voir le document en entier --- -/--	1, 4, 5, 7, 8, 19-24, 26-31



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 octobre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/10/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Pauwels, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. nde internationale No

PCT/FR 98/01220

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>J.A. RIGGS ET AL.: "Nucleotide carrier mixture with transport selectivity for Ribonucleoside-5'-phosphates" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 37, no. 35, 1996, pages 6303-6306, XP002079553 OXFORD GB</p> <p>voir page 6304; figure 1; tableau 1</p> <p>-----</p>	<p>1,2,19, 20,23-30</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation Mondiale de l'Intellectuelle No

PCT/FR 98/01220

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5635487 A	03-06-1997	AUCUN	
WO 9514651 A	01-06-1995	US 5665879 A	09-09-1997
		AU 677144 B	10-04-1997
		AU 1370795 A	13-06-1995
		CA 2176714 A	01-06-1995
		EP 0730568 A	11-09-1996
		JP 9505593 T	03-06-1997
		US 5776908 A	07-07-1998
		NO 962075 A	10-07-1996